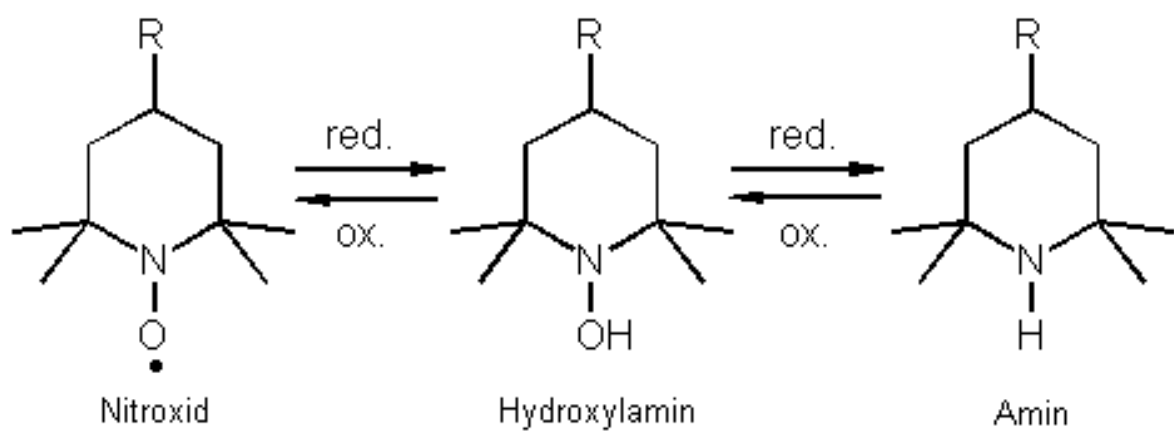


Christian Kroll

Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden

sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und
biopharmazeutischer Untersuchungen



Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden
sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und
biopharmazeutischer Untersuchungen



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Pharmazie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Apotheker Christian Kroll
geboren am 15. Mai 1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter:

1. **Prof. Dr. H.-H. Borchert**
2. **Prof. Dr. R. Stößer**
3. **Prof. Dr. P. Surmann**

Tag der Abgabe: 10. Mai 1999

Tag der mündlichen Prüfung: 13. August 1999

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-H. Borchert, dem ich an dieser Stelle besonders danken möchte.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Stößer vom Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin sowie PD Dr. Karsten Mäder und Dr. Werner Herrmann für die Unterstützung bei den ESR-Messungen und die stete Diskussionsbereitschaft in allen Fragen.

Herrn Thomas Plauschin und Herrn Dr. Kurt Osterloh von der Magnettech - Gesellschaft für Meß- und Steuertechnik mbH Berlin-Adlershof danke ich für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Andreas Langner, Frau Ingeborg Dobbrott, Frau Ursula Muschick, Anja Hepner und allen anderen Kollegen des Instituts für die enge Zusammenarbeit.

Vom Arbeitskreis Pharmazeutische Analytik des Instituts für Pharmazie danke ich besonders Herrn Dr. Karl-Heinz Schwarz für die elektrochemischen Untersuchungen sowie Herrn Dr. Peter Witte und Herrn Helmar Döhnert für die umfangreiche Unterstützung bei den gaschromatographischen und massenspektrometrischen Arbeiten.

Prof. Dr. Hideo Utsumi danke ich für die Möglichkeit zeitweise in seiner Arbeitsgruppe an der Kyushu University (Japan) arbeiten zu dürfen, sowie Dr. Takeshita, Dr. Ischikawa, Kim, Hiroshi, Mayumi, Ken-ichi und Kinki für die vielen schönen Stunden in Fukuoka.

Abschließend möchte ich besonders Ulrike für die allseitige und ständige Unterstützung und Hilfe während der Erstellung der vorliegenden Arbeit danken.

Kurzfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Untersuchungen zur Analytik, Stabilität und Metabolisierung von Nitroxylradikalen, unter besonderer Berücksichtigung Ihrer Anwendung als ESR-Spinsonden im Rahmen der Bearbeitung pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Fragestellungen.

Neben der Entwicklung und Adaptierung geeigneter analytischer Methoden waren dabei Stabilitätsfragen unter den Bedingungen ihres Einsatzes, die Stabilität von Reaktionsprodukten und Metaboliten, das elektrochemische und chemische Reduktionsverhalten sowie die Biotransformation durch Mikroorganismen, in subzellulären Fraktionen der Leber und in humanen Zellkulturen von besonderem Interesse.

Als wichtigste Ergebnisse dieser Arbeit sind: (i) bisher unbekannte Metaboliten (wie z.B. sekundäre Amine) identifiziert, (ii) der Erkenntnisstand zu den Mechanismen der Biotransformation dieser stabilen Radikale erweitert, (iii) methodische Fortschritte wie die Entwicklung einer On-line HPLC-ESR-Kopplung und bei der Anwendung der Festphasenmikroextraktion (SPME) erreicht, (iv) die ESR als Methode für nichtinvasive Messungen des pH-Wertes und für die Erfassung der Stabilität und Hautpenetration von Liposomen erschlossen worden.

Abstract

The present thesis was focused on the investigation of analytic, stability and metabolism of nitroxyl radicals used as esr spin probes in pharmaceutical, technological and biopharmaceutical applications. New analytical methods were developed and adapted for nitroxides and diamagnetic products. The stability of nitroxides was analysed and reaction products were cleared up. Furthermore there were investigated the electrochemical and chemical behaviour of reduction as well as the biotransformation by microorganisms, in subcellular liver fractions and in human cell cultures.

The main results of this document are presented in the following: (i) the appearance of new dia- and paramagnetic metabolites (e.g. secondary amines), (ii) the latest findings about metabolic mechanisms of stable nitroxyl radicals, (iii) the development of online HPLC-ESR-coupling technique and the application of solid phase microextraction (SPME) as the greatest acquisition, (iv) the advantage of ESR technique for noninvasive measurement of pH and to register the stability and penetration of liposomes through skin layers.

Inhaltsübersicht

1	Einleitung und Problemstellung	10
2	Untersuchte Verbindungen	14
3	Analytik der untersuchten Verbindungen	21
4	Untersuchungen zur Stabilität von Nitroxylradikalen	115
5	Untersuchungen zum chemischen und elektrochemischen Reduktionsverhalten von Nitroxylradikalen	129
6	Untersuchungen zur In-vitro-Biotransformation von Nitroxylradikalen	146
7	In-vitro-Bestimmung der Proteinbindung von Nitroxylradikalen	207
8	Einsatzmöglichkeiten von Nitroxylradikalen im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Fragestellungen	211
9	Zusammenfassende Diskussion und Schlußfolgerungen	232
10	Gewonnene neue Erkenntnisse - Kurzzusammenfassung	238
11	Material und Methoden	239
	Abkürzungsverzeichnis	258
	Publikationsliste	259
	Literaturverzeichnis	262

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	10
2	UNTERSUCHTE VERBINDUNGEN	14
2.1	STRUKTUR DER VERBINDUNGEN.....	14
2.2	ERFASSUNG AUSGEWÄHLTER PHYSIKOCHEMISCHER EIGENSCHAFTEN.....	16
3	ANALYTIK DER UNTERSUCHTEN VERBINDUNGEN.....	21
3.1	QUALITATIVE ANALYTIK.....	21
3.1.1	Elektronenspinresonanzspektroskopie (X- und S-Band-ESR)	23
3.1.2	Entwicklung einer On-line HPLC-ESR-Kopplung.....	29
3.1.3	Massenspektrometrie (MS) und Gaschromatographie- Massenspektrometrie (GC-MS)- Kopplung.....	39
3.1.4	Kernresonanzspektroskopie (^1H - und ^{13}C -NMR).....	85
3.1.5	Infrarot-Spektroskopie (IR)	89
3.1.6	Differentielle Puls Polarographie (DPP).....	92
3.1.7	Chromatographische Verfahren	92
3.2	QUANTITATIVE ANALYTIK.....	95
3.2.1	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)	95
3.2.2	Gaschromatographie (GC)	99
3.3	EXTRAKTIONSMETHODEN.....	102
3.3.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion	102
3.3.2	Festphasenextraktion (SPE)	103
3.3.3	Festphasenmikroextraktion (SPME)	105
3.4	ZUSAMMENFASSENDE SCHLUßFOLGERUNGEN	114
4	UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT VON NITROXYLRADIKALEN.....	115
4.1	STABILITÄT IN WÄßRIGER LÖSUNG	115
4.2	STABILITÄT IM KÜNSTLICHEN MAGEN- UND DARMSAFT	118
4.3	STABILITÄT UNTER STREßBEDINGUNGEN.....	121
4.4	STABILITÄT GEGENÜBER IONISIERENDER STRAHLUNG.....	125
4.5	STABILITÄT VON REAKTIONSPRODUKTEN.....	125
4.6	SCHLUßFOLGERUNGEN	128

5 UNTERSUCHUNGEN ZUM CHEMISCHEN UND ELEKTROCHEMISCHEN

REDUKTIONSVERHALTEN VON NITROXYLRADIKALEN	129
5.1 GRUNDLEGENDE REAKTIONSMECHANISMEN VON NITROXYLRADIKALEN.....	129
5.2 ELEKTROCHEMISCHES REDUKTIONSVERHALTEN	131
5.3 CHEMISCHES REDUKTIONSVERHALTEN VON NITROXYLRADIKALEN	136
5.3.1 Einfluß von pH-Wert auf die Reduktion	136
5.3.2 Untersuchungen zur Protonenübertragung	142
5.4 SCHLUßFOLGERUNGEN	144
6 UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO-BIOTRANSFORMATION VON NITROXYLRADIKALEN	146
6.1 MIKROBIELLE METABOLISIERUNG IN PILZKULTUREN (GATTUNG CUNNINGHAMELLA)	146
6.2 BIOTRANSFORMATION IN SUBZELLULÄREN SYSTEMEN DER RATTENLEBER	153
6.2.1 Zytosol	154
6.2.2 Mikrosomen	157
6.2.3 Mitochondrien	159
6.3 BIOTRANSFORMATION IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER...	160
6.4 BIOTRANSFORMATION IN DER HUMANEN KERATINOZYTENZELLKULTUR HACAT.....	166
6.4.1 Identifizierung von Metaboliten.....	166
6.4.2 Bildung des sekundären Amins in Keratinozyten.....	169
6.4.3 Einfluß von Inhibitoren und Mechanismen der Metabolisierung.....	172
6.4.4 Untersuchungen zur Toxizität von Nitroxiden in Keratinozyten.....	176
6.5 UNTERSUCHUNGEN ZU MECHANISMEN DER REDUKTION VON NITROXIDEN IN MITOCHONDRIEN UND SUBMITOCHONDRIALEN PARTIKELN	184
6.5.1 Problemstellung	184
6.5.2 Untersuchungen an isolierten Mitochondrien	185
6.5.3 Einfluß von Inhibitoren auf die Reduktion	189
6.5.4 Untersuchungen an submitochondrialen Partikeln	193
6.5.5 Untersuchungen zur Reoxidation von Hydroxylaminen	195
6.5.6 Diskussion der Befunde und Schlußfolgerungen.....	200
6.6 SCHLUßFOLGERUNGEN DER UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO- BIOTRANSFORMATION	205
7 IN-VITRO-PROTEINBINDUNG VON NITROXYLRADIKALEN.....	208

8	EINSATZMÖGLICHKEITEN VON NITROXYLRADIKALEN IM RAHMEN PHARMAZEUTISCH-TECHNOLOGISCHER UND BIOPHARMAZEUTISCHER FRAGESTELLUNGEN	212
8.1	PH-MESSUNG MITTELS PH-SENSITIVER IMIDAZOLNITROXYLRADIKALE	212
8.1.1	Methodenentwicklung und Kalibrierung.....	213
8.1.2	pH-Messung in wäßrigen Systemen.....	217
8.1.3	pH-Messung in nichttransparenten Systemen	218
8.1.4	Diskussion der pH-Messungen mittels ESR	220
8.2	ORIENTIERENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR INTEGRITÄT, PENETRATION UND PERMEATION VON LIPOSOMEN AN ISOLIERTER HAUT SOWIE ZUM EINFLUß VON ENHANCER AUF DIE PENETRATION MIT HILFE DER ESR-SPEKTROSKOPIE UND ESR-TOMOGRAPHIE	221
8.2.1	Herstellung von Modell-Liposomen	223
8.2.2	Meßanordnung.....	225
8.2.3	Integrität von Modell-PC-Liposomen in isolierter Mäusehaut.....	228
8.3	DISKUSSION.....	231
9	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION UND SCHLUßFOLGERUNGEN.....	233
10	GEWONNENE NEUE ERKENNTNISSE - KURZZUSAMMENFASSUNG-	239
11	MATERIAL UND METHODEN.....	240
11.1	UNTERSUCHTE SUBSTANZEN	240
11.2	WEITERE CHEMIKALIEN.....	240
11.3	ANALYTISCHE METHODEN	241
11.3.1	Spektroskopie.....	241
11.3.2	Chromatographische Verfahren.....	241
11.3.3	Massenspektrometrie	242
11.3.4	On-line HPLC-ESR-Kopplung.....	242
11.3.5	Weitere Analysenmethoden.....	242
11.3.6	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten P	243
11.3.7	Extraktionsmethoden.....	243
11.4	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN.....	244
11.5	PILZ- UND ZELLKULTUR SOWIE ORGANPERFUSION.....	244
11.5.1	Cunninghamella elegans ATCC 9245 und echinulata ATCC 9244	244

11.5.2	Isoliert perfundierte Rattenleber	245
11.5.3	Keratinozytenlinie HaCaT	245
11.5.4	Hautpräparation.....	247
11.6	SUBZELLULÄRE FRAKTIONEN DER RATTENLEBER	247
11.6.1	Zellaufschluß und Gewinnung subzellulärer Fraktionen.....	247
11.6.2	Beurteilung der Reinheit von isolierten Zellfraktionen	249
11.7	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	251
11.8	IN-VITRO-BESTIMMUNG DER PROTEINBINDUNG.....	252
11.9	MASSENSPEKTREN VON REFERENZSUBSTANZEN, REAKTIONSPRODUKTEN UND METABOLITEN	253

1 Einleitung und Problemstellung

Die Elektronenspinresonanz (ESR^a)-Spektroskopie hat in den letzten Jahren eine wachsende Bedeutung in der biomedizinischen Forschung sowie auch auf pharmazeutisch-technologischem und biopharmazeutischem Gebiet erhalten. Dies ist sowohl auf die verbesserte Anpassung kommerzieller ESR-Spektrometer an die biologischen Untersuchungssysteme für nichtinvasive In-vivo-Untersuchungen und die Bereitstellung geeigneter Spinsonden und Spintraps, als auch auf die zunehmende Kenntnis über die Rolle freier Radikale in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen [1] zurückzuführen. International findet die ESR in den Biowissenschaften größere Aufmerksamkeit, wovon unter anderem die Aktivitäten von drei renommierten Forschungszentren in den USA (National Biomedical ESR Center, Milwaukee/ Wisconsin; Biotechnology Resource in Pulsed EPR Spectroscopy, New York; Illinois EPR Research Center (IERC), Urbana/ Illinois) sowie zahlreicher anerkannter japanischer Hochschul- und Forschungseinrichtungen zeugen. In Deutschland existieren bisher keine vergleichbaren Einrichtungen zur Entwicklung und Anwendung der In-vivo-ESR-Spektroskopie mit primär biopharmazeutisch und pharmazeutisch-technologischer Ausrichtung.

Neben der Erfassung freier Radikale und der Untersuchung endogener Paramagnetika [z.B. Eisen-Ionen im Cytochrom P-450, Mangan-Ionen in der Mn-Superoxiddismutase (SOD) oder Radikale der Ascorbinsäure] ist der Einsatz von stabilen paramagnetischen Verbindungen, hauptsächlich von Nitroxylradikalen, von besonderem Interesse in der Pharmazie. Diese Verbindungen werden als "Reportermoleküle" (Spinsonden^b) genutzt, da sie Aussagen über ihre unmittelbare molekulare Umgebung ermöglichen. Auf diesem Wege lassen sich Mikropolarität, Mikroviskosität [2] und pH-Wert auch in farbigen, festen und nichttransparenten Matrices in situ bestimmen [3, 4]. Durch die hohe Selektivität dieser Methode entfällt oft eine aufwendige Probenvorbereitung, wodurch das Auftreten von Artefakten vermindert und die direkte nichtinvasive Messung in vitro und in vivo durchführbar wird. Weiterhin ist es möglich, sowohl Pharmaka als auch Arzneistoffträger mit diesen stabilen Nitroxylradikalen zu "labeln", und auf diesem Wege Informationen zur Pharmakokinetik der gelabelten Verbindungen zu gewinnen [5].

^a Die Abkürzungen ESR (electron spin resonance) und EPR (electron paramagnetic resonance) werden synonym gebraucht.

^b Es besteht seit mehreren Jahren internationaler Konsens diese Verbindungen generell als Spinsonden oder *spin probes* zu bezeichnen. Im Gegensatz dazu sind Spinlabel Verbindungen, bei denen eine Spinsonde kovalent an eine andere Substanz, z.B. ein Makromolekül, gebunden ist.

Stabile Nitroxylradikale sind auch als potentielle Arzneistoffe von Interesse, einerseits als Kontrastmittel für die NMR-Tomographie und andererseits aufgrund ihrer Superoxiddismutase (SOD) mimetischen [6, 7, 8, 9] und antioxidativen Eigenschaften [10]. Darüber hinaus stellen Nitroxylradikale selbst potentielle Arzneistoffe dar, da sie ein großes antioxidatives Potential [11] besitzen. Nitroxylradikale besitzen außerdem die Fähigkeit, Radikale zu fangen und zeichnen sich offensichtlich durch eine geringe Toxizität aus. So sind z.B. Piperidinnitroxide in der Lage, sowohl den zellschädigenden Effekt von ionisierender Strahlung auf humane Zellen in vitro [12], als auch den strahlungsinduzierten Haarverlust bei Mäusen [13] und Schweinen [14] signifikant zu vermindern.

Neuere technische Entwicklungen gestatten die Aufnahme mehrdimensionaler spektral, zeitlich bzw. räumlich aufgelöster ESR Spektren in vitro und in vivo [15]. Durch spezielle Varianten der ESR-Spektroskopie (ESR-Imaging und lokalisierte ESR-Spektroskopie) lassen sich paramagnetische Spezies bezüglich ihrer Natur differenziert und orts aufgelöst nachweisen. Hierbei können neben kinetischen Fragestellungen auch biopharmazeutisch relevante Systemeigenschaften (Mikroviskosität, Mikropolarität, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck) kontinuierlich ortslalisiert erfaßt und untersucht werden. Die Grenze für die Ortsauflösung der ESR-Signale beträgt z.Z. 5- 10 µm im X-Band und ca. 100 µm im S-Band-Bereich.

Weiterführende Untersuchungen zur Analytik, Stabilität und Metabolisierung der Nitroxide erscheinen vor dem Hintergrund ihrer Verwendung als Spinsonden in vitro und in vivo sowie als potentielle Wirkstoffe somit sinnvoll und notwendig. Trotz ihrer breiten Anwendungsmöglichkeiten sind systematische Untersuchungen zur Analytik, Stabilität und Metabolisierung von Nitroxylradikalen bisher nur in geringem Umfang durchgeführt worden, wobei fast ausschließlich ESR-Methoden zum Einsatz kamen. Es ist in der Fachliteratur mehrfach belegt worden, daß Nitroxide in vivo und in vitro zu den diamagnetischen und damit ESR "stummen" Hydroxylaminen reduziert werden [3, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Obwohl von einigen Autoren vermutet, konnten weitere diamagnetische Biotransformationsprodukte bisher nicht eindeutig identifiziert werden [22, 23], da dies durch den ausschließlichen Einsatz der ESR-Spektroskopie nicht möglich war. Informationen über die kombinierte Anwendung anderer spektroskopischer oder chromatographischer Methoden liegen in der Literatur nur wenig vor.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen deshalb systematische Untersuchungen ausgewählter Nitroxylradikale in verschiedenen Systemen, durch die der Kenntnisstand zur

chemischen und biochemischen Stabilität dieser Verbindungen unter besonderer Berücksichtigung ihres Reduktionsverhaltens erweitert werden sollte. Die dabei eingesetzten Modellsysteme, die unterschiedliche nichtenzymatische sowie enzymatische Komponenten enthalten und Untersuchungen zum elektrochemischen Reaktionsverhalten einschließen, unterscheiden sich im Hinblick auf die Komplexität der möglichen Wechselwirkungen mit den untersuchten Nitroxylradikalen. Hinsichtlich der Spezifität, der aus den Ergebnissen abzuleitenden Aussagen zu den beteiligten Reaktionsmechanismen, ist ebenfalls zwischen den Untersuchungssystemen zu differenzieren (siehe Abbildung 1).

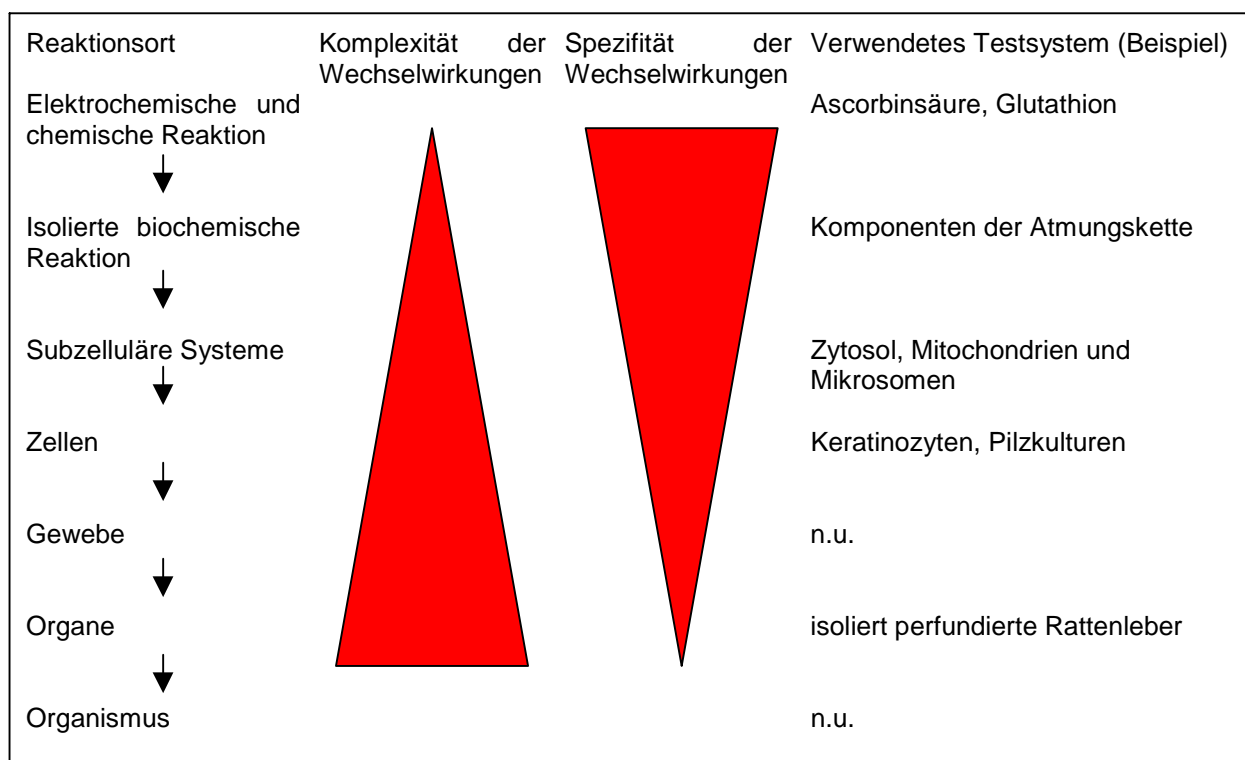


Abbildung 1: Ausgewählte Modellsysteme

Im Ergebnis dieser Untersuchungen sollten die **gebildeten Reaktionsprodukte**, einschließlich Metaboliten, **identifiziert und quantifiziert**, sowie **neue Erkenntnisse zur Reaktivität und zu den Mechanismen der Biotransformation** von Nitroxylradikalen gewonnen werden.

Eine eng mit den Untersuchungen zur Stabilität, Reaktivität und Biotransformation in Zusammenhang stehende Aufgabenstellung bestand in der Auswahl und Etablierung geeigneter **Methoden der Probenvorbereitung und Analytik**, durch die der Nachweis und die Quantifizierung verschiedener paramagnetischer und diamagnetischer Reaktionsprodukte ermöglicht wurde. Dabei konzentrieren sich die Bemühungen vor allem

auf die Etablierung der **Festphasenmikroextraktion (SPME)** bei der Gaschromatographie und die Entwicklung einer **On-line HPLC-ESR-Kopplung**.

Schließlich bestand eine weitere Zielstellung dieser Arbeit, mit der nichtinvasiven Messung des pH-Wertes mittels pH-sensitiver Spinsonden sowie der Erfassung der Stabilität und Hautpenetration von Liposomen, weitere **neue biopharmazeutische Anwendungsgebiete** für die ESR zu erschließen.

2 Untersuchte Verbindungen

2.1 Struktur der Verbindungen

Die Untersuchungen wurden an Nitroxylradikalen (Nitroxiden) mit Piperidin-, Pyrrolidin-, Imidazolin- und Imidazolidinstruktur durchgeführt. Diese N,N-disubstituierten Verbindungen verfügen über ein ungepaartes Elektron und sind somit paramagnetisch. Das Radikal wird nach *Aurich et al.* [24] stabilisiert über drei π -Elektronen, die über zwei Atomzentren verteilt sind, sowie über eine sterische Abschirmung durch jeweils zwei α -ständige Methylgruppen. Die Lebensdauer dieser Radikale (als Feststoff) kann sich über Monate bis Jahre erstrecken. Sie sind somit stabiler als viele paramagnetische Addukte von Spintraps. Systematische Untersuchungen zur Stabilität von Nitroxiden, insbesondere z.B. in wäßrigen Pufferlösungen oder organischen Lösungsmitteln, liegen in der Literatur bisher nicht vor.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Piperidinnitroxide^a unterscheiden sich ausschließlich im Substituenten in 4-Position am Piperidinring (Abbildung 2). Von den untersuchten Pyrrolidin-, Imidazolin- und Imidazolidinnitroxiden sind lediglich **9** (PCA) und **12** kommerziell erhältlich. Das PCA-Anhydrid (**10**) wurde selbst hergestellt (siehe 11.1). Die Imidazolin- bzw. Imidazolidinnitroxide **11**, **12** und **13** (Abbildung 3) wurden vom Institut für Bioorganische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften zur Verfügung gestellt.

In der in dieser Arbeit verwendeten Nomenklatur kennzeichnet jede Ziffer (z.B. **1**) ein bestimmtes Nitroxylradikal. Die zusätzlichen Buchstaben bedeuten:

B - das korrespondierende Hydroxylamin (z.B. **1B**);

C - das sekundäre Amin (z.B. **1C**);

D - das entsprechende Piperidon (z.B. **1D**).

Die Strukturformeln der Verbindungen mit entsprechender Numerierung sind in Abbildung dargestellt. Die Hydroxylamine **1B**, **2B** und **12B**, die sekundären Amine **1C**, **2C** und **4C** sowie das Piperidon **1D** standen als Referenzsubstanzen (siehe Abbildung 4) zur Verfügung (Bezugsquelle: siehe 11.1).

^a Entsprechend der chemischen Nomenklatur handelt es sich eigentlich um Piperidinoxyle, bzw. Pyrrolidin-, Imidazolin- und Imidazolidinoxyle. Um auf die verschiedenen Ringstrukturen der untersuchten Nitroxide hinzuweisen, wurde die obige, international weit verbreitete Benennung der Verbindungen verwendet und auf die vollständigen IUPAC-Namen in Kapitel 11.1 verwiesen.

Untersuchte Verbindungen

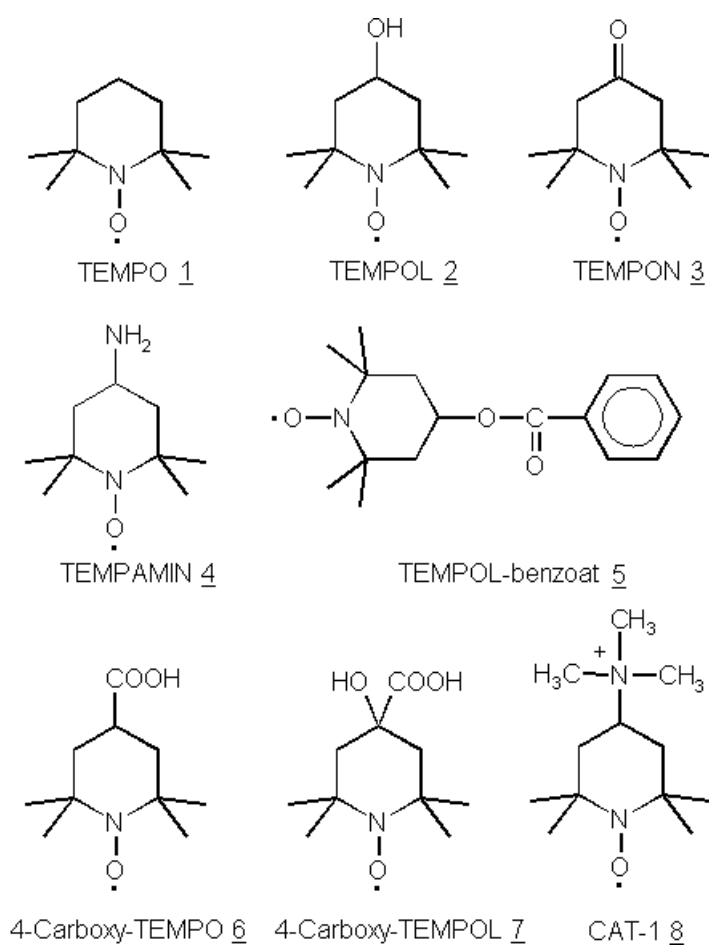


Abbildung 2: Strukturformeln der untersuchten Nitroxide mit Piperidinstruktur.

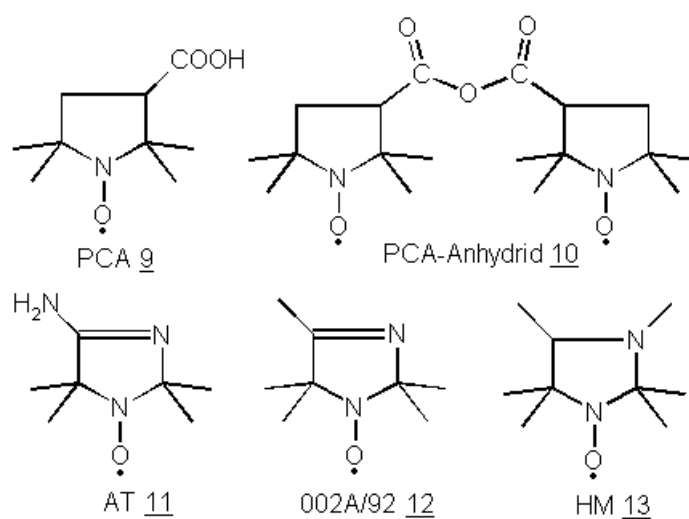


Abbildung 3: Strukturformeln der untersuchten Nitroxide mit Pyrrolidin-, Imidazolin- und Imidazolidinstruktur.

Untersuchte Verbindungen

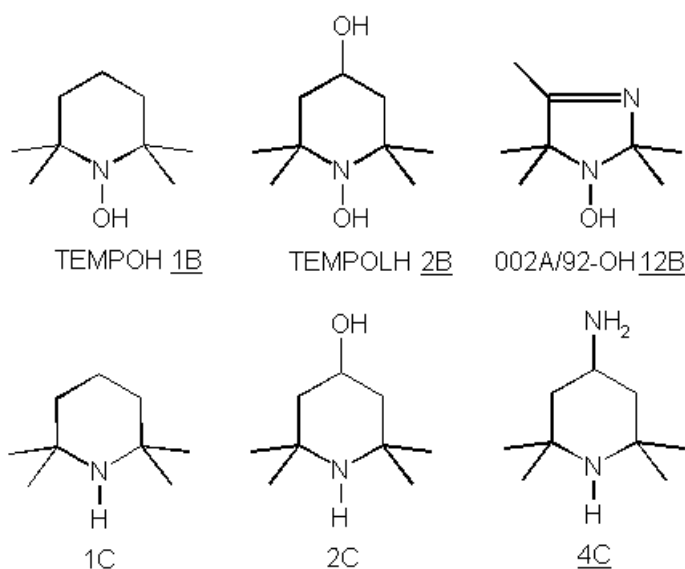


Abbildung 4: Strukturformeln der als Referenzsubstanzen verfügbaren Hydroxylamine und sekundären Amine.

2.2 Erfassung ausgewählter physikochemischer Eigenschaften

Die untersuchten Spinsonden sind bei Raumtemperatur meist kristalline, mehr oder weniger stark rot gefärbte Substanzen. Obwohl die Nitroxide schon seit relativ langer Zeit verfügbar sind, gibt es in der Literatur kaum Angaben zu analytisch und biopharmazeutisch relevanten physikochemischen Eigenschaften bzw. sind diese widersprüchlich [3]. Aus diesem Grund wurden einige ausgesuchte Eigenschaften für die untersuchten Substanzen (Schmelzbereich, Absorptionsmaxima der optischen Spektren, Löslichkeit und Lipoid-Wasser-Verteilungskoeffizienten) im Rahmen der Arbeit ermittelt. Die relativen Molekülmassen der Verbindungen sowie zusätzliche Angaben zum Schmelzbereich, zu UV-Extinktionsmaxima und zur Löslichkeit sind in Tabelle 1 dargestellt.

Die Löslichkeit der untersuchten Piperidinnitroxide in Wasser wird hauptsächlich durch die Eigenschaften des Substituenten in 4-Stellung am Piperidinring bestimmt, während zwischen den untersuchten Imidazolin-, Imidazolidin- und Pyrrolidinnitroxiden nur sehr geringe Löslichkeitsunterschiede bestehen.

Tabelle 1: Ausgewählte Physikochemische Eigenschaften der untersuchten Nitroxylradikale.

Nitroxid	Nr.	IUPAC-Name	MM	Schmelz- temperatur (°C)	λ_{\max}^a (nm)	Löslichkeit ^b Methanol	Löslichkeit Wasser
TEMPO	<u>1</u>	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl	156,2	38-39	243,6	++	+/-
TEMPOL	<u>2</u>	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	172,2	64- 65	242,2	++	++
TEMPON	<u>3</u>	4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	170,2	37	234,6	++	++
TEMPAMIN	<u>4</u>	4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	171,3	flüssig-ölig	243,0	++	++
TEMPOL-benzoat	<u>5</u>	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-benzoat	276,31	103	223,0/ 273,4	++	--
Carboxy-TEMPO	<u>6</u>	4-Carboxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	200,26	163	245,0	++	++
4-Carboxy- TEMPOL	<u>7</u>	4-Carboxy-4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl	216,26	flüssig- schmierig	205,4	++	++
Cat-1	<u>8</u>	4-Trimethylamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	214,3	> ° 200	239,6	-	++
PCA	<u>9</u>	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidin-1-oxyl	186,23	198	238,4	++	++
PCA-anhydrid	<u>10</u>	2,2,5,5-Tetramethyl-pyrrolidin-1-oxyl-3-carbonsäureanhydrid	354,4	ölig	240,0	++	-
AT	<u>11</u>	4-Amino-2,2,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl	156,21	° 211	234,3	++	++
002A/92	<u>12</u>	2,2,4,5,5-pentamethylimidazolin-1-oxyl	155,22	flüssig-ölig	240,5	++	++
HM	<u>13</u>	2,2,3,4,5,5-Hexamethylimidazolidin-1-oxyl	171,27	43	237,4	++	++

(^a λ_{\max} in isotonischem Phosphatpuffer, pH = 7,4 / ^b Löslichkeit: ++ leicht löslich; + löslich; +/- wenig löslich; - schwer löslich, -- sehr schwer löslich; Löslichkeitskriterien nach dem Europäischen Arzneibuch [25]) / ^c Zersetzung der Verbindung

Verteilungskoeffizienten

Im Hinblick auf die Extrahierbarkeit bei der Probenvorbereitung und das pharmakokinetische Verhalten sind insbesondere die Lipoid/ Wasser-Verteilungskoeffizienten (P) der untersuchten Verbindungen von Interesse. Bestimmt wurden die scheinbaren n-Octanol/ Wasser und n-Heptan/ Wasser-Verteilungskoeffizienten (siehe Tabelle 2), wobei als wäßrige Phase isotonischer Phosphatpuffer (pH 7,4; Temperatur 37°C) verwendet wurde. Die Ausgangskonzentration der Verbindungen in der wäßrigen Phase betrug 1 mmol•l⁻¹ (bei Nitroxid **5**; 0,1 mmol•l⁻¹). Die Berechnung von P erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$P = \frac{V_W(c_W^0 - c_W^t)}{V_L \cdot c_W^t}$$

V_L: Volumen der lipophilen Phase (ml)

V_W: Volumen der wäßrigen Phase (ml)

c_W⁰: Konzentration der Substanz in der wäßrigen Phase vor Versuchsbeginn (mmol•l⁻¹)

c_W^t: Konzentration der Substanz in der wäßrigen Phase bei Versuchsende (mmol•l⁻¹)

Die Konzentration der Nitroxide wurde nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts in der wäßrigen und in der organischen Phase über die ESR-Signalamplitude (siehe Abbildung 12) mit Hilfe entsprechender Kalibrierfunktionen ermittelt.

Tabelle 2: Lipoid/ Wasser-Verteilungskoeffizienten der Verbindungen.

Verbindung	n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient	n-Heptan/Wasser-Verteilungskoeffizient
1	63	20
2	3,7	0,12
3	1,6	0,8
4	0,1	0,34
5	>> 100	>> 100
6	0	0,04
7	0	0
8	0	0
9	0	0,08
11	0,9	0,08
12	3,1	1,4
13	5,5	1,6
1C	5,4	4,7
2C	1,9	1,8
4C	0,3	0,5

Zur Quantifizierung der diamagnetischen Verbindungen wurden die Peakflächen der erhaltenen optischen Remissionssignale nach HPTLC-Trennung verwendet.

Da einige Derivate über protonierbare bzw. deprotonierbare funktionelle Gruppen verfügen,

wurde für die Piperidinnitroxide **4** und **6** sowie für das Pyrrolidinderivat **9** zusätzlich die pH-Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten untersucht und auf diese Weise der pK_a-Wert der entsprechenden funktionellen Gruppe ermittelt (siehe Abbildung 5).

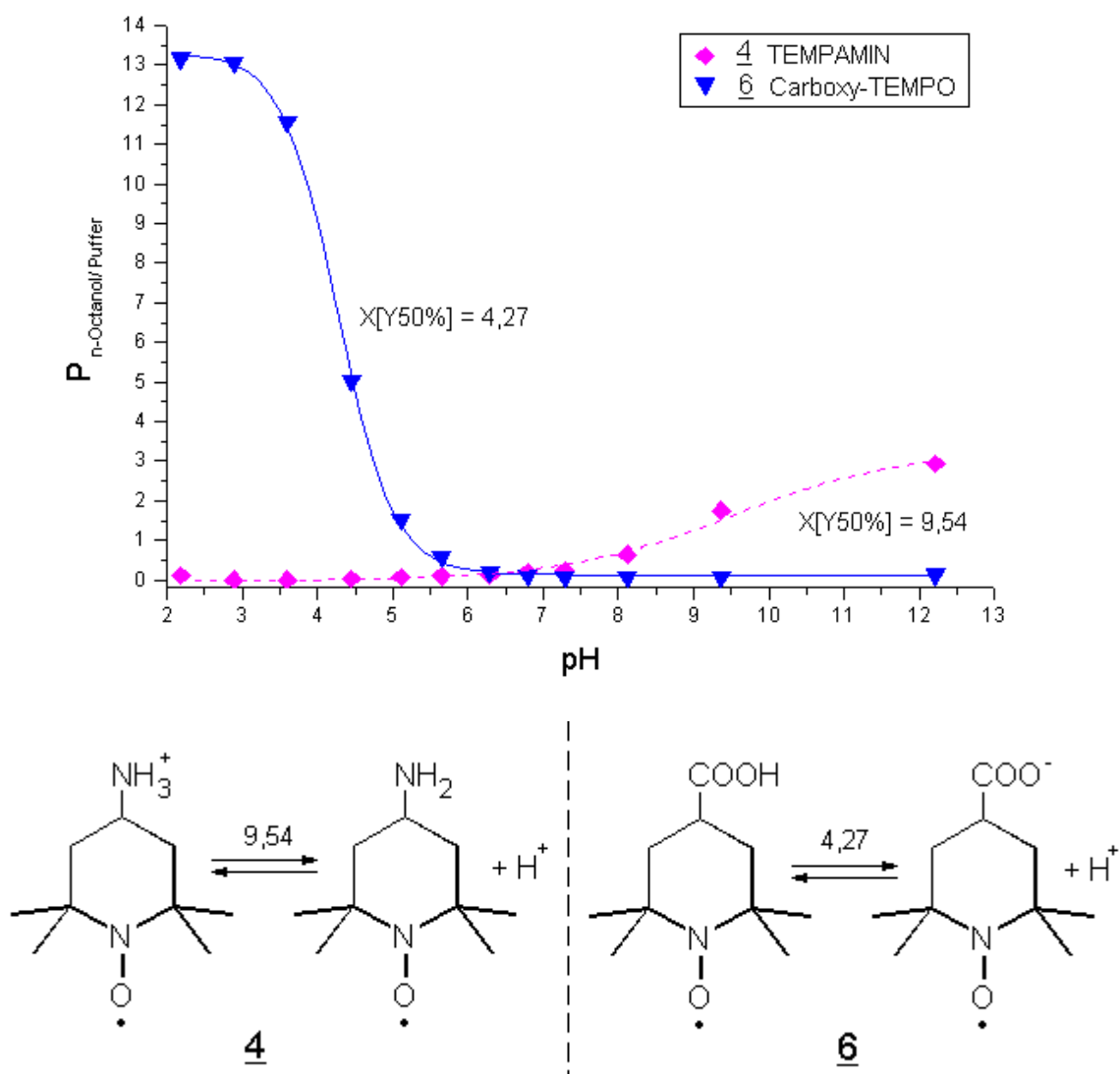


Abbildung 5: Abhängigkeit des scheinbaren Verteilungskoeffizienten $P_{n\text{-Octanol/Puffer}}$ von **4** (4-Amino-TEMPO) und **6** (Carboxy-TEMPO) vom pH-Wert der Pufferlösung. Der Wert X[Y50%] gibt das Verhältnis von 1:1 der protonierten zur nichtprotonierten Form an und entspricht somit dem pK_a-Wert der Carboxy- bzw. Aminogruppe am Piperidinringsystem.

Die Verteilungskoeffizienten des Pyrrolidinnitroxides **9** werden ebenfalls durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst, da hier pH-abhängig die Carboxylfunktion in protonierter bzw. deprotonierter Form vorliegt. Nach Literaturangaben (*Sentjurs et al.* [16]) liegt der pK_a-Wert bei 4,5, wobei aber keine Hinweise zur Bestimmungsmethode gemacht wurden. Bei eigenen

Untersuchte Verbindungen

Untersuchungen wurde der pK_a -Wert dagegen mit 3,6 bestimmt. Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte eine beginnende Disproportionierung des Radikals zum diamagnetischen Hydroxylamin und Oxammoniumkation bei $pH < 2$ sein, so daß die Ausgangsverbindung nicht mehr quantitativ vorliegt und die Kurvenanpassung im stark sauren Bereich keine exakten Werte für $X[Y50\%]$ liefert.

3 Analytik der untersuchten Verbindungen

Für den Nachweis und die Quantifizierung von Nitroxylradikalen wurden entsprechend der Literatur bisher überwiegend ESR-spektroskopische Verfahren angewendet. Auf diese Weise lassen sich organische Radikale qualitativ und quantitativ gut erfassen. Als problematisch ist dagegen der Versuch der Quantifizierung von diamagnetischen Reaktionsprodukten mittels ESR nach vorgeschalteter Reoxidation anzusehen, wie er in einer Reihe von Arbeiten publiziert wurde, da diese Reoxidation meist nicht vollständig und reproduzierbar bzw. kontrolliert abläuft. Diesbezügliche Untersuchungen unter Berücksichtigung der Befunde weiterer spektroskopischer Methoden oder chromatographischer Verfahren sind dagegen in der Literatur bisher nur selten beschrieben worden.

Da im Rahmen dieser Arbeit neben den paramagnetischen Verbindungen auch diamagnetische Reaktionsprodukte nachgewiesen, identifiziert und quantitativ bestimmt werden sollten, konzentrierten sich die eigenen analytischen Untersuchungen auf eine entsprechende Erweiterung des Methodenspektrums. Neben der ESR wurden dabei im Hinblick auf die Identifizierung unbekannter Reaktionsprodukte die MS, GC-MS, IR- und NMR-Spektroskopie und für den Nachweis sowie die quantitative Bestimmung die GC, HPTLC und HPLC berücksichtigt.

Ein besonderer Stellenwert für die Untersuchungen der Reduktionskinetik kommt der Entwicklung der On-line HPLC-ESR-Kopplung zu. Für die Überprüfung des elektrochemischen Reduktionsverhaltens wurde die Differentielle Puls Polarographie (DPP) herangezogen. Weitere Voruntersuchungen haben die Überprüfung der Eignung verschiedener Extraktionsverfahren zur Probenvorbereitung zum Ziel.

3.1 Qualitative Analytik

Zur Sicherstellung der Zuverlässigkeit der entsprechenden analytischen Ergebnisse erfolgte im Rahmen der Methodenentwicklung eine Überprüfung der Validierungselemente die in den ICH^a-Guidelines definiert sind [26, 27].

Diese sind in Abbildung 6 schematisch dargestellt:

^a International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH).

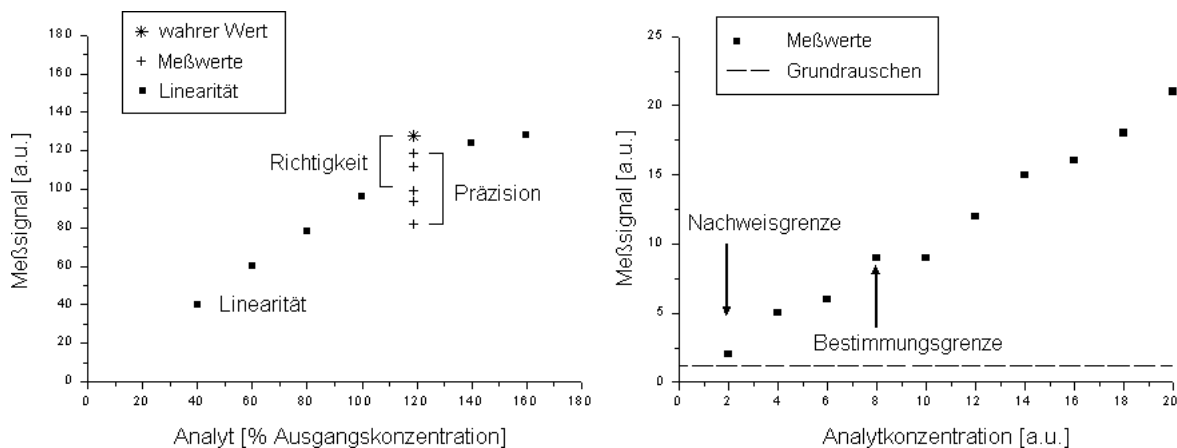


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Validierungselemente nach *Ermer et al.* [28].

Die *Spezifität* der geprüften analytischen Verfahren wurde jeweils durch ausreichende Trennung der Analyten von anderen Bestandteilen der Probenmatrix (GC, HPLC und HPTLC: Peakauflösung^a $R_S > 1$) sowie durch strukturspezifische Erfassung (ESR, NMR, MS, elektrochemisch) gesichert.

Die *Kalibrierfunktionen* der verwendeten quantitativen Methoden (GC, HPTLC, ESR) wurde durch Regressionsanalyse bestimmt. Die Beurteilung der *Linearität* der Kalibrierfunktion und die Festlegung des Kalibrierbereiches erfolgte anhand von mindestens 5 Analytkonzentrationen ($n = 5$).

Die *Richtigkeit* der Methoden wurde durch Verwendung von mehreren unabhängigen Einwaagen und unter Anwendung zweier unabhängiger Methoden (z.B. GC und HPTLC) gesichert.

Als Maß für die *Präzision* wurde die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) verwendet. Dabei wurden sowohl die Präzision in Serie als auch die Wiederholungspräzision ermittelt.

Die *Nachweisgrenze* wurde aus dem Signal/ Rausch-Verhältnis (S/N 3:1) und die *Bestimmungsgrenze* anhand deren Definition über die maximal zulässige Präzision und Richtigkeit ermittelt. Letztere setzt sich in der Analytik zunehmend gegenüber der Definition über das Signal/ Rausch-Verhältnis durch.

^a Die Peak-Auflösung und die Peak-Symmetrie wurden berechnet nach DAB 10 Kommentar V.6.20.

Nach internationalen Empfehlungen wird im Bereich der Bioanalytik an der Bestimmungsgrenze als Maß für die Präzision eine relative Standardabweichung von 20 % und für die Richtigkeit eine relative Abweichung vom richtigen Wert von $\pm 20 \%$ zugelassen (vgl. [29]).

3.1.1 Elektronenspinresonanzspektroskopie (X- und S-Band-ESR)

Die ESR-Spektroskopie gehört ebenso wie die NMR-Spektroskopie zu den magnetischen Resonanzmethoden. Sie beruht auf der Absorption von Strahlung im dm- und cm-Bereich durch ungepaarte Elektronen in einem starken äußeren Magnetfeld. Dabei werden mittels der Mikrowellenenergie ungepaarte Elektronen zum Übergang auf ein energetisch höheres Spinniveau angeregt werden. Die unterschiedlichen Massen von Elektron und Proton und die daraus resultierenden stark unterschiedlichen magnetischen Momente bedingen unterschiedliche Übergangsenergien zwischen den Zeeman-Niveaus und erfordern verschiedene Frequenzen der elektromagnetischen Strahlung. Mit Hilfe der Resonanzbedingung ($\omega = \gamma_e \hbar B_0$; γ_e : e⁻, N) resultieren unterschiedlich starke äußere Magnetfelder für die ESR und die NMR. Während der Bereich zwischen 100 und 600 MHz für die NMR typisch ist, werden bei der ESR meist Frequenzen im GHz-Bereich angewandt. Dadurch unterscheiden sich die „Zeitfenster“ und mittelbar die Empfindlichkeit (s.u.) der beiden Methoden. Die Anwendung der X-Band-ESR-Spektroskopie mit Frequenzen um 9 GHz gestattet es, Prozesse vom Mikrosekunden bis in den Pikosekundenbereich zeitlich zu verfolgen. Aus den unterschiedlichen magnetischen Momenten von Elektron und Kern ergibt sich auch eine höhere Empfindlichkeit der ESR, da die Besetzungsunterschiede der Niveaus im thermischen Gleichgewicht der Boltzmannverteilung gehorchen.

Die ESR-Spektroskopie ist somit eine sehr selektive und empfindliche Methode zur Detektion paramagnetischer Spezies, speziell von Nitroxylradikalen. Als Nachweisgrenze für das Nitroxide 2 konnte eine Konzentration von $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ im X-Band-Bereich (X-Band-ESR-Spektrometer MS-100) ermittelt werden. Dabei wurde die klassische Form eines Hohlraumresonators, der Rechteckresonator verwendet (siehe Abbildung 7).

Die zu messende Probe wird in einer geeigneten Meßzelle, in der Regel eine Kapillare oder eine Quarzflachzelle, in den Resonator eingebracht. Da im Hohlraumresonator nur im Grenzfall eine Trennung von elektrischem und magnetischem Feld (E- bzw. B-Feld) erfolgt, reagiert der Resonator sehr empfindlich auf die Beladung durch eine Probe, die seine elektrischen und speziell dielektrischen Eigenschaften verändert. Dies ist besonders bei Proben der Fall, die durch ihren Elektrolytgehalt die Mikrowellenenergie stark dämpfen. Auf

diese Problematik wird im Kapitel 3.1.2 *Entwicklung einer On-line HPLC-ESR-Kopplung* gesondert eingegangen.

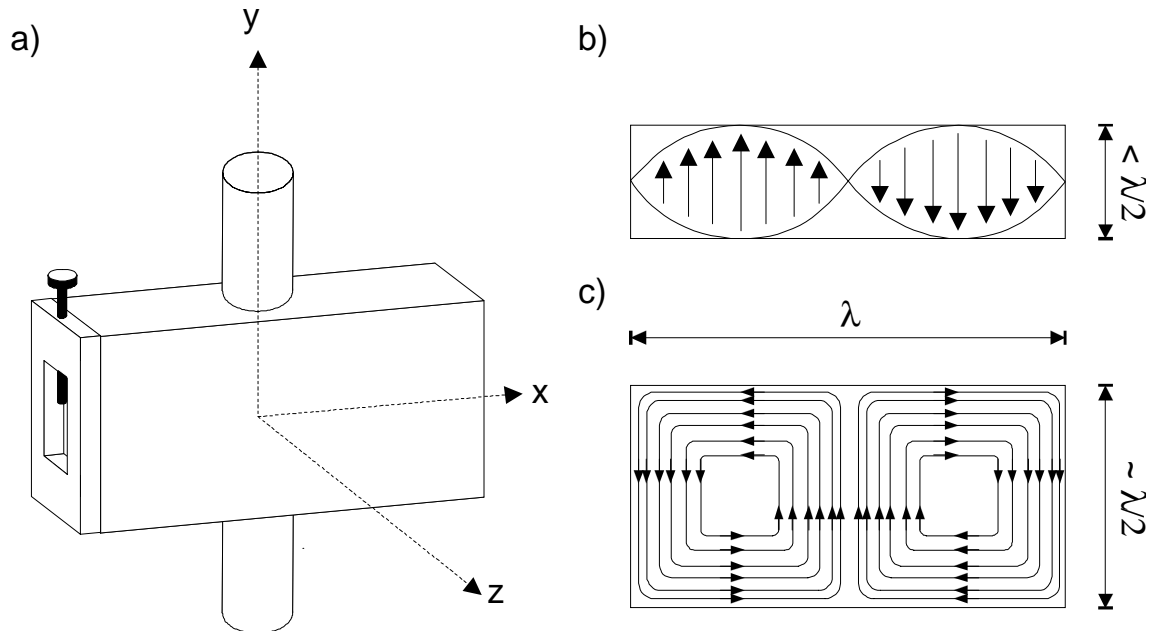


Abbildung 7: a) Schematische Darstellung des verwendeten Rechteckresonators, b) Konturverlauf des E-Feldes in der Draufsicht, c) Konturverlauf des B-Feldes in der Seitenansicht.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden zwei weitere X-Band-ESR-Spektrometer, ein JEOL-PX-1 (JEOL, Japan) und ein ERS 300 (ZWG, Berlin-Adlershof), eingesetzt.

Neben den beschriebenen X-Band-Spektrometern wurde ebenfalls ein S-Band-ESR-Spektrometer, das MT-1 der Magnettech GmbH, eingesetzt. Dieses Spektrometer arbeitet im 2 GHz-Bereich unter der Verwendung von Schleifenresonatoren, welche auch als Oberflächenspulen angesehen werden können. Diese Oberflächenspulen ermöglichen die Untersuchung ausgewählter räumlicher Bereiche größerer Objekte (z.B. mit Probe gefüllte Eppendorfgefäße oder isolierte Hautstücke), die den X-Banduntersuchungen nicht mehr zugänglich sind. Dies wird durch die gute Trennung des magnetischen und elektrischen Feldes der Oberflächenspulen bei der entsprechenden Meßfrequenz erreicht, wodurch auch größere Untersuchungsobjekte relativ problemlos eingebracht werden können.

Im Rahmen eines DFG-Projektes (Bo 1350/1-1) von Juni 1995 bis Mai 1997 wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Magnettech GmbH Berlin-Adlershof S-Band-Resonatormodifizierungen und -optimierungen durchgeführt, so daß verschiedene Probengeometrien erfaßt werden können. Derartige Resonatorkonstruktionen waren bisher kommerziell nicht erhältlich (siehe Abbildungen 8 und 9).



Abbildung 8: Abbildung der entwickelten S-Band-Schleifenresonatoren (Oberflächenspulen) mit einer geraden und einer um 90 Grad abgewinkelten Oberflächenspule (ermöglicht z.B. auch In-vivo-ESR-Messungen an der Haut von Nacktmäusen oder am Unterarm von Probanden).

Die Funktionsweise der ESR-Oberflächenspulen beruht auf dem Prinzip der Leitungsresonanz, wobei der eigentliche Resonator eine symmetrische Zweidrahtleitung mit der Länge $\frac{3}{4} \lambda$ darstellt (siehe Abbildung 9). Am Probenort liegt eine maximale magnetische Feldstärke und ein Minimum der elektrischen Feldstärke vor.

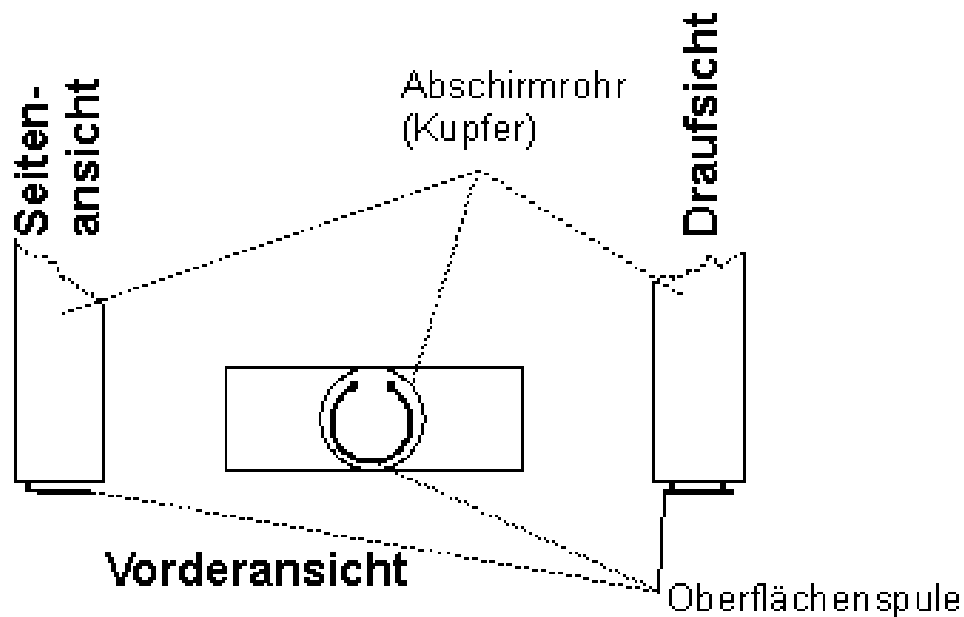


Abbildung 9: Schematische Abbildung der um 90 Grad abgewinkelten Oberflächenspule für S-Band-ESR-Messungen aus drei verschiedenen Ansichtsebenen.

Somit lassen sich auch stark dämpfende biologische Proben vermessen. Für die ESR-Messungen steht damit ein flexibler und robuster Resonator mit hoher Empfindlichkeit zur Verfügung, wobei der Probenkopf leicht an verschiedene Probengeometrien angepaßt werden kann.

Bei Verwendung der Oberflächenspule ist zu beachten, daß im Gegensatz zum klassischen Hohlraumresonator mit zentrierter Probe, der Abstand der Oberflächenspule zum Untersuchungsobjekt, bei der Bestimmung der ESR-Signalintensität explizit zu berücksichtigen ist (vgl. Abbildung 10).

Die S-Band-ESR-Messung besitzt somit zusätzlich zur spektralen auch eine räumliche Komponente. So läßt sich z.B. bei der Untersuchung der Penetration von Spinsonden an Hautproben, bei Kenntnis der Reduktionsgeschwindigkeit der Sonden zu den diamagnetischen Reaktionsprodukten in der Probe, die Penetrationstiefe der applizierten Verbindungen aus der gemessenen ESR-Signalamplitude abzuschätzen.

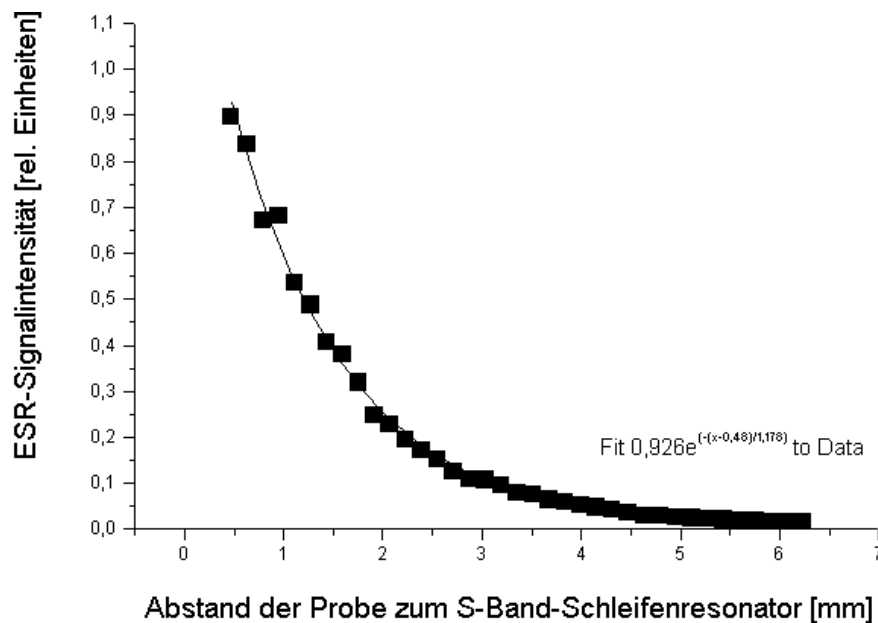


Abbildung 10: Gemessene S-Band-ESR-Signalamplitude des freien Radikals 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in Abhängigkeit vom Abstand der Probe zur Oberflächenspule.

Nitroxylradikale

Bei den untersuchten Nitroxiden handelt es sich "langlebige" organische Radikale. Sie sind paramagnetisch und somit der ESR-Spektroskopie zugänglich. Das ungepaarte Elektron der Nitroxylradikalgruppe kann im Rahmen eines stark vereinfachten Modells sowohl stärker am Sauerstoff, als auch am Stickstoff lokalisiert sein, wobei das Molekül im letzteren Fall als Zwitterion vorliegt (siehe Abbildung 11). Die Lage dieses Gleichgewichtes wird dabei weitgehend durch die Polarität der äußeren Umgebung bestimmt.

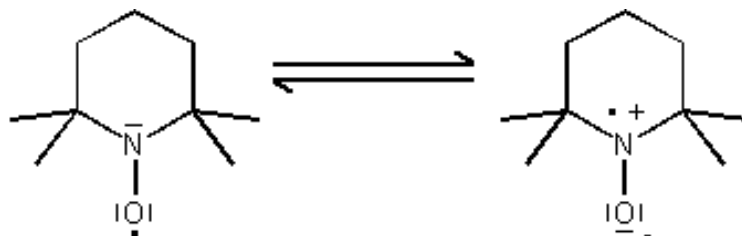


Abbildung 11: Mesomere Grenzformen der Lokalisierung des ungepaarten Elektrons an der paramagnetischen Nitroxylfunktion bei Nitroxiden.

In einem stark polaren Lösungsmittel wie Wasser ist das Zwitterion bevorzugt. Dabei ist die

Aufenthaltswahrscheinlichkeit des ungepaarten Elektrons am Stickstoffkern (Kernspin-Elektronenspin-Wechselwirkung) erhöht. Dies schlägt sich im ESR-Spektrum durch eine Zunahme der Stickstoffhyperfeinkopplung nieder. Die Hyperfeinkopplungskonstante a_N des ESR-Signals der Nitroxide repräsentiert dabei die Wechselwirkung des magnetischen Moments des ungepaarten Elektrons mit dem des Stickstoffkerns.

Die Erfassung der Mikropolarität der Spinsondenumgebung und der Verteilung dieser Verbindungen zwischen hydrophilen und lipophilen Phasen lässt sich mit Hilfe der ESR-Spektroskopie durch die Veränderung von a_N ermitteln [30, 31].

Abbildung 12 zeigt das typische ESR-Signal eines ^{14}N -Nitroxylradikals mit der charakteristischen Aufspaltung in ein Linientriplett. Die Aufspaltung (a_N) des abgebildeten ESR-Signals wird auch als Stickstoffhyperfeinkopplungskonstante bezeichnet. Dieses charakteristische Triplett wird durch die Kopplung mit dem ^{14}N -Stickstoffkern (Kernspinquantenzahl $I = 1$) hervorgerufen. Die ^{15}N -Spinsonden ($I = 1/2$) zeigen dagegen eine Aufspaltung in ein Liniendublett im ESR-Spektrum.

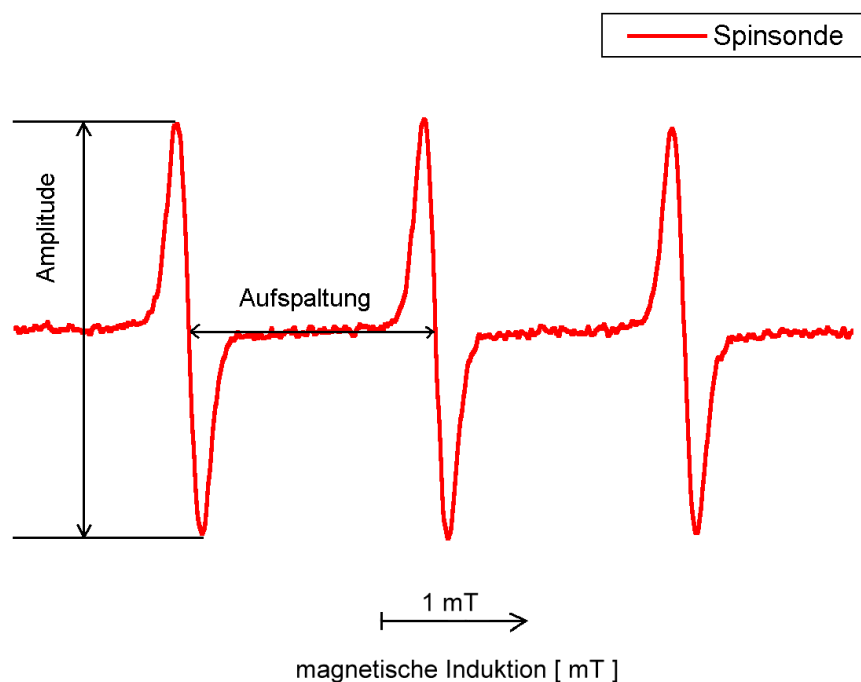


Abbildung 12: ESR-Spektrum der ^{14}N -Piperidinspinsonde **2** (TEMPOL; Temp. 25 °C; Konz.: 0,25 mmol·l⁻¹) in isotonischem Saccharose-Puffer (pH 7,4) gemessen mittels S-Band-ESR-Spektrometer MT-1.

3.1.2 Entwicklung einer On-line HPLC-ESR-Kopplung

Zum Nachweis und zur Bestimmung von Nitroxylradikalen wurde eine On-line HPLC-ESR-Kopplung als neue, bisher nicht beschriebene Analysenmethode erarbeitet. Die konventionelle ESR-Spektroskopie bietet zwar die Möglichkeit, einzelne radikalische Komponenten zu detektieren und zu charakterisieren, bereitet aber Probleme bei der Untersuchung von Gemischen zweier oder mehrerer paramagnetischer Spezies, da häufig komplex zusammengesetzte Spektren erhalten werden. Um eine entsprechende Auswertung durchführen zu können, sind Spektrenbearbeitungen und -simulationen notwendig, deren Möglichkeit jedoch bei ähnlichen g-Werten und Kopplungskonstanten, z.B. bei Nitroxylradikalen, begrenzt ist. Einen Ausweg bietet in diesem Fall die chromatographische Auftrennung der verschiedenen paramagnetischen Spezies mittels HPLC vor der ESR-Detektion als On-line HPLC-ESR.

Da heute in der Regel cw („continuous wave“)-ESR-Spektrometer eingesetzt werden, ist eine einfache Kopplung, wie sie bei der HPLC-FT-NMR seit einer Reihe von Jahren mit Erfolg praktiziert wird, wenig erfolgversprechend [32]. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Magnetech eine On-line HPLC-(cw)-ESR-Kopplung entwickelt, bei der das verwendete X-Band-Spektrometer (Miniscope MS 100) direkt über ein eigens für diesen Zweck konstruiertes 3-Wege-Ventil an den DAD-(Dioden-Array-Detektor)-Ausgang eines handelsüblichen Merck-Hitachi-HPLC-Gerätes angeschlossen wurde. Damit kann jedes gemessene ESR-Signal eindeutig einem bestimmten separierten HPLC-Peak zugeordnet werden.

On-line HPLC-(cw)-ESR-Kopplungen wurden in der Literatur schon mehrfach beschrieben [33, 34, 35, 36]. Dabei wurde das X-Band ESR-Spektrometer ebenfalls direkt an den Ausgang des jeweiligen HPLC-Gerätes angekoppelt, wodurch die cw-ESR-Messung somit direkt abhängig von der Flußrate der mobilen HPLC-Phase war (siehe Abbildung 13). Wegen der hohen Dielektrizitätskonstante von Wasser muß das Probenvolumen für X-Band ESR-Messungen auf 30 - 50 µl begrenzt werden. Bei einer Flußrate von 1 ml/ min durchlaufen somit ca. 20 Probenvolumina pro Minute die ESR-Meßzelle. Schmale und kleine Peaks werden somit nur schwer erfaßbar bzw. sind in dieser Anordnung nicht detektierbar. Die Auswirkungen des Probenflusses auf die ESR-Messung sind in Abbildung 13 dargestellt.

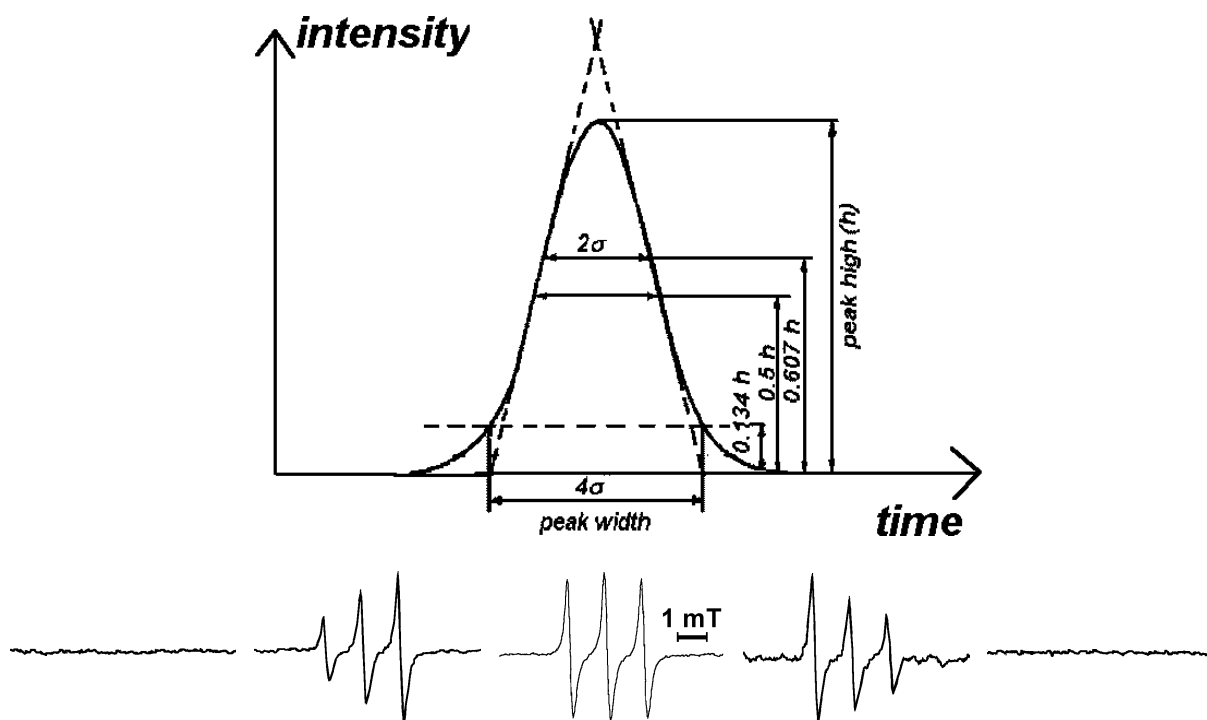


Abbildung 13: Gemessene ESR-Spektren von **2** (initial 1 mmol·l⁻¹) bei kontinuierlichem Probenfluß durch die Quarzzelle (klassische On-line HPLC-ESR-Kopplung ohne Umschaltventil und Durchflußzelle).

Um eine HPLC-stop-flow-Technik mit allen daraus resultierenden Nachteilen für die Auftrennung zu vermeiden, waren als Konsequenz dieser Kopplung extrem kurze ESR-Scanzeiten notwendig. Bedingt durch die relativ große Induktivität des verwendeten Magneten ist die minimal mögliche Registrierzeit bei der cw-ESR-Messung limitiert (beim MS 100 auf 11 s) und führt zu Verlusten an ESR-Signalintensität. Die Empfindlichkeit verschlechterte sich um den Faktor 3-5 und mußte dementsprechend durch höher konzentrierte Proben kompensiert werden [37]. Bei der eigenen Meßanordnung [38] wurde durch Einbau eines PEEK-T-Stückes in die Kopplungsbrücke in Verbindung mit einem nachgeschalteten elektronisch angesteuerten 3-Wege-Ventil die cw-Messung unabhängig von der Geschwindigkeit der mobilen HPLC-Phase gestaltet (siehe Abbildung 14). Unter Verwendung von **2** als HPLC-stabiles Nitroxylradikal wurde die günstigste Kopplungszeit zwischen dem Auftreten der Peakmaxima der UV-Detektion und einem größtmöglichen cw-ESR-Signal untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß beim verwendeten Versuchsaufbau und einer Flußrate von 1 ml/ min. die günstigste Zeit 17 Sekunden beträgt.

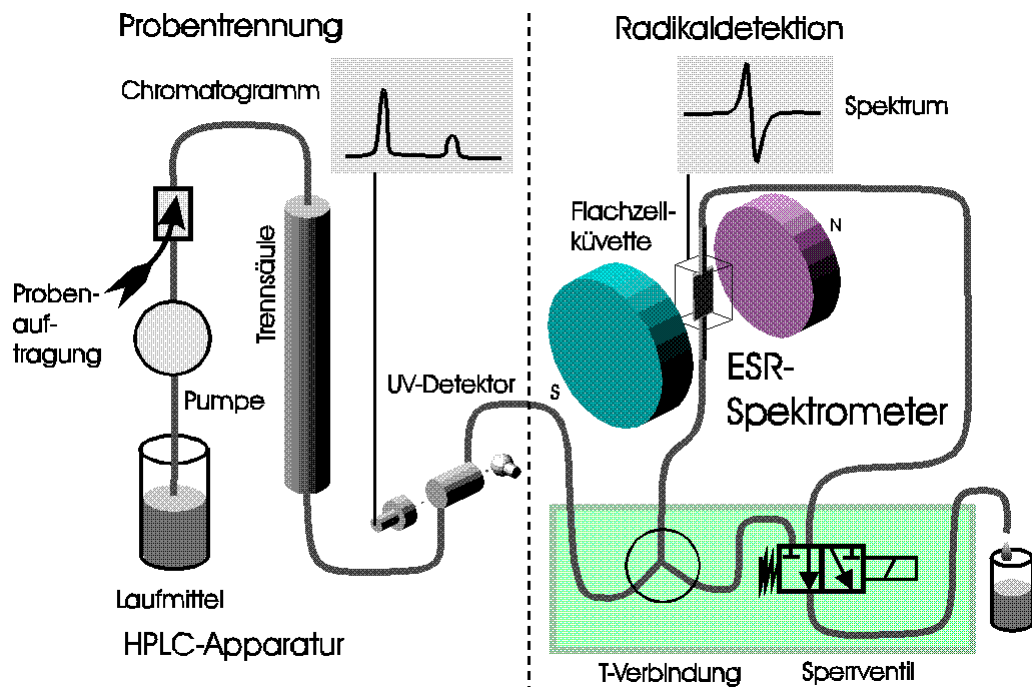


Abbildung 14: Schematischer Aufbau^a und praktische Realisierung der eigenen On-line HPLC-X-Band-ESR-Kopplung mit zwischengeschaltetem PEEK-T-Stück, einem PEEK-Shunt und nachgeschaltetem 3-Wege-Ventil.

^a Herrn Dr. Osterloh, Freie Universität Berlin, möchte ich für die Bereitstellung der Abbildung danken.

Die unvermeidbare Peakverbreiterung durch den chromatographischen Prozess wird durch das Füllungsvolumen der ESR-Flachzelle (40 μ l) teilweise ausgeglichen, da das ESR-Signal über einen Zeitbereich „integriert“ erfaßt wird (z.B bei einem von Fluß 1 ml/ min und 40 μ l Volumen wird ein Chromatogrammausschnitt von 2,4 s pro ESR-Spektrum erfaßt). Exakte Quantifizierungen sind auch bei unsymmetrischen Peaks möglich, vorausgesetzt die Basisbreite ist nicht zu groß. Die optimale Kopplungszeit hängt somit direkt von der HPLC-Flußrate und der HPLC-Peaksymmetrie ab. Ist nun die ESR-Flachzelle mit einer optimalen Menge an paramagnetischer Substanz gefüllt, wird das 3-Wege-Ventil umgeschaltet 17 s nach UV-Detektion), und die nachfolgende Probe fließt direkt in das Abfallgefäß. Der laminare Fluß der mobilen Phase durch die eigens konstruierte ESR-Flachzelle wurde durch die Aufnahme von Partikelflußprofilen im Strömungstechnischen Labor Berlin-Adlershof des Hermann-Föttinger-Instituts für Thermo- und Fluidynamik, TU Berlin, überprüft und bestätigt. Durch diese laminare aufsteigende Füllung der Flachzelle wird das Auftreten von Verwirbelungen und Gasbläschen minimiert. Gleichzeitig wird auf diese Weise ein Leerlaufen der Flachzelle verhindert. Somit läßt sich die Scanzeit der ESR-Messung verlängern und eine Spektrenakkumulation wird ebenfalls möglich. Die Nachweisgrenze des ESR-Spektrometers für Nitroxide sinkt mit Hilfe des modifizierten HPLC-ESR-Kopplungsverfahrens von 50 μ mol \cdot l⁻¹ auf 2,5 μ mol \cdot l⁻¹ (Probenvolumen der Flachzelle 40 μ l) und die Empfindlichkeit steigt um den Faktor 20. Voraussetzung für diese Arbeitsweise ist die ausreichende chromatographische Auftrennung der einzelnen ESR-aktiven Analyten (Auflösung > 1,5). Tabelle 3 zeigt die gefundenen Meßparameter für die untersuchten Piperidinnitroxide.

Tabelle 3: Charakterisierung ausgewählter Nitroxide mittels On-line HPLC-ESR-Kopplung.

Nitroxid	t _R [min] ¹	a _N [mT] ²
<u>1</u>	5,57	1,75
<u>2</u>	2,96	1,72
<u>3</u>	3,01	1,62
<u>4</u>	8,28	1,71
<u>5</u>	6,89	1,70
<u>6</u>	2,85	1,72

¹ Säule: HP RP-18 100 (10 μ m); Probenvolumen 20 μ l; Säulentemperatur: 20°C; Bestimmung der Totzeit mit Thioharnstoff (t₀ = 2,37 min) Methode: Verhältnis Laufmittel: 0-5 min MeOH:H₂O 50:50, danach Gradient bis 10min MeOH 100% / ² X-Band-ESR-Spektrometer MS-100

Die Retentionszeiten der Verbindungen nehmen bei Verwendung einer RP-18 HPLC-Säule mit steigender Lipophilie zu. Einzige Ausnahme bildet die Aminoverbindung 4 mit dem höchsten t_R-Wert der Piperidinnitroxide. Dies könnte auf die nicht optimalen

Trenneigenschaften der verwendeten HP RP-18 Säule für primäre Amine zurückzuführen sein. Als problematisch für die Stabilität von Nitroxylradikalen während der chromatographischen Trennung sind Sauerstoff, Schwermetallspuren und aktive Oberflächen an der stationären HPLC-Phase anzusehen. Um diese Einflüsse weitgehend ausschließen zu können, wurde folgende Maßnahmen durchgeführt:

Durch intensives Spülen (> 30 min) der mobilen Phasen mit Stickstoff vor der HPLC-Trennung kann, bedingt durch den Überdruck innerhalb des gesamten Systems, von einer weitgehenden Abwesenheit von Sauerstoff ausgegangen werden.

Die gemessene Konzentration an Eisen (14,1 ppm) und Kupfer (17,8 ppm) in der mobilen Phase liegt nahe an der Bestimmungsgrenze dieser Elemente^a. Ein Unterschied zwischen Laufmittel und Eluat konnte nicht festgestellt werden, so daß ein Auswaschen dieser Elemente, aus der stationären Phase als wenig wahrscheinlich anzusehen ist.

Testchromatogramme mit Standardtestgemischen (Surface Activity Test Kit für RP-HPLC Säulen; enthält ein Gemisch bestehend aus der relativ starken Base Amilorid und der schwachen Base Diethylanilin) zeigten annähernd die vorgegebene Auflösung und Peaksymmetrie (bei allerdings kürzeren t_R als vorgegeben), so daß aktive Oberflächen bei den verwendeten RP-18 Säulen [z.B. MERCK LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) und HP RP-18 100 (10 µm)] weitgehend ausgeschlossen werden können.

Weiterhin wurde für alle verwendeten RP-HPLC-Säulen die "Totzeit" unter Verwendung von Thioharnstoff, einer unter den gewählten Bedingungen nicht retardierten Verbindung, für die entsprechenden mobilen Phasen bestimmt. Die Totzeit von Thioharnstoff (gelöst in der mobilen Phase) betrug $t_0 = 1,85$ min für die HPLC-Säule MERCK LiChrospher 100 RP-18 (5 µm; mobile Phase Acetonitril:Wasser = 60:40) und $t_0 = 2,37$ min für die HPLC-Säule Hewlett Packard RP-18 100 (10 µm; mobile Phase Methanol:Wasser = 50:50), Detektion jeweils bei 246,5 nm. Die bei Methanol-Wasser-Mischungen häufig auftretenden Luftbläschen beeinträchtigen sowohl die chromatographische Trennung als auch die Detektion mittels X-Band-ESR. Durch die Verwendung von entgasten Methanol-Puffer-Lösungen und das anschließende partielle Zudosieren von Methanol bei der HPLC-Gradiententechnik konnte dieses Problem weitgehend behoben werden.

^a Ich danke Herrn Dipl.-Chem. Günther Berndt für die Durchführung der polarographischen Eisen- und Kupferbestimmung in den mobilen HPLC-Phasen.

Die On-line HPLC-ESR-Kopplung wurde zur Untersuchung des aus **9** (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidin-1-oxyl) synthetisierten Anhydrids **10**, einem in kristalliner Form bei 4 °C weitgehend stabilen Biradikal, angewendet (Abbildung 15).

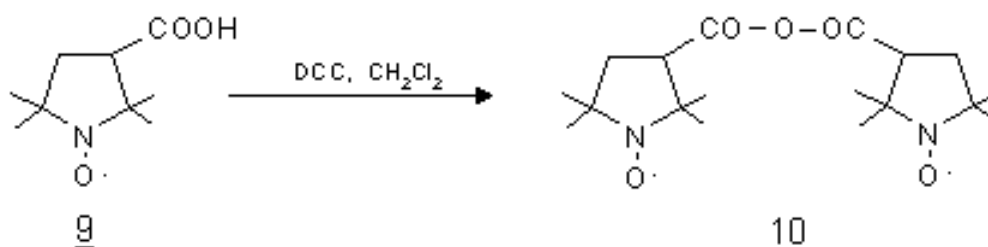


Abbildung 15: Prinzip der Synthese von **10** (PCA-Anhydrid) aus **9** (PCA) (vgl. [39] ; DCC= Dicyclocarbodiimid).

Das gebildete Derivat **10** ist von besonderem Interesse, da es eine wichtige Ausgangsverbindung zum "Spinlabeling" von Arzneistoffen (z.B. von Proteinen) ist. Außerdem liegen keine Untersuchungen zur Analytik, Stabilität und Reinheit dieser Verbindung in der Literatur vor.

Nach Synthese, Abtrennung von nicht umgesetzten Nitroxid **9** und DCC sowie gebildeten Dicyclohexylharnstoff mittels Säulenchromatographie und einer weiteren SC-Reinigung des Anhydrids **10** liefert die unmittelbar vor der Messung in Methanol gelöste Probe, das in Abbildung 16 dargestellte ESR-Spektrum.

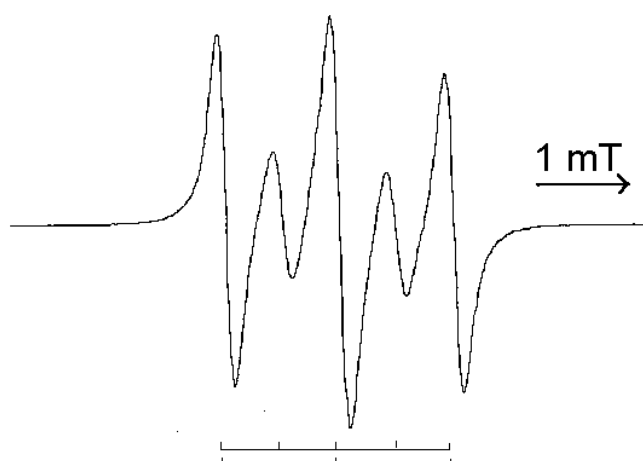


Abbildung 16: X-Band-ESR-Spektrum des Produkts der Anhydrid-Synthese **10** nach SC-Reinigung (siehe auch ESR-Spektren nach HPLC-Trennung in Abbildung 18).

Das ESR-Signal zeigt mit fünf Linien die Aufspaltung des erwarteten Biradikals [5]. Die Signalsymmetrie weist allerdings auf die starke Überlagerung eines Signaltuplett hin, so daß

eine Verunreinigung mit Verbindung **9**, aufgrund einer unvollständigen Abtrennung nicht umgesetzter Ausgangsverbindung oder partieller Hydrolyse von **10** zu vermuten war. Die On-line HPLC-ESR-Untersuchung dieser Probe zeigte bei UV-Detektion deutliche Peaks von 4 Fraktionen, die auch intensive ESR-Signale liefern und somit radikalischer Natur sind (Peaks 1- 4 ; Abbildung 17 und 18).

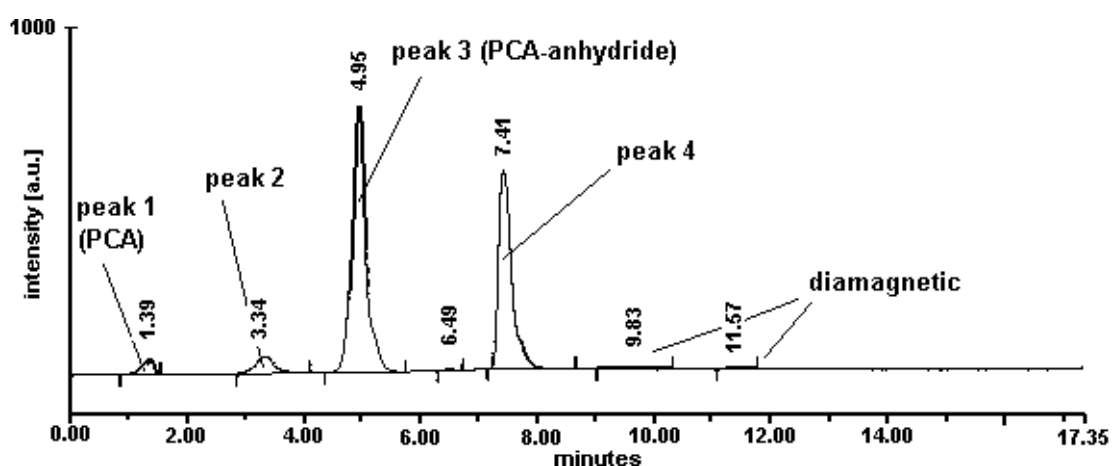


Abbildung 17: Chromatogramm des synthetisierten und durch SC gereinigten Anhydrids **10** (HPLC mit RP-18 Säule, UV-Detektion bei 254 nm).

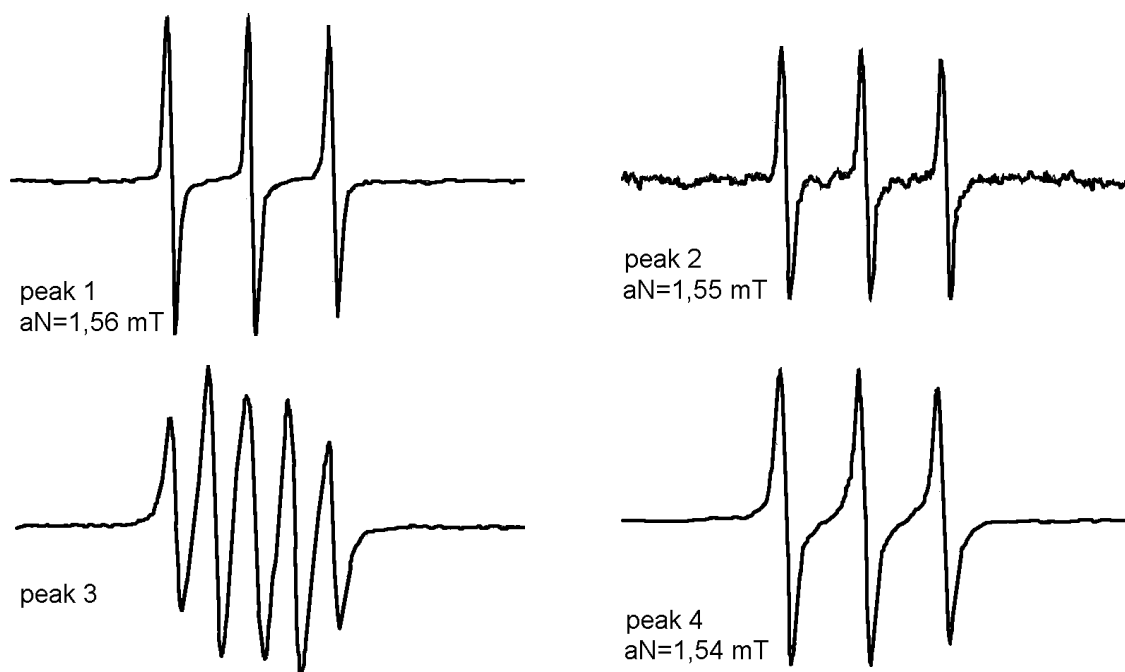


Abbildung 18: Durch On-line HPLC-ESR-Kopplung erhaltene Spektren der Fraktionen.

Dabei weist nur die Fraktion 3 das für ein Biradikal typische Spektrum mit den fünf breiten

Linien auf (Hyperfeinkopplungskonstante $a_N/2$), während die anderen Fraktionen (Peak 1, 2 und 4), das für Nitroxide mit einem radikalischen Zentrum charakteristische Dreiliniensignal zeigen. Das Fehlen von Peak 3 im Chromatogramm des Syntheseproduktes nach vorhergehender Hydrolyse unterstreicht, daß es sich bei Fraktion 3 um das Anhydrid **10** handelt (siehe Abbildung 19).

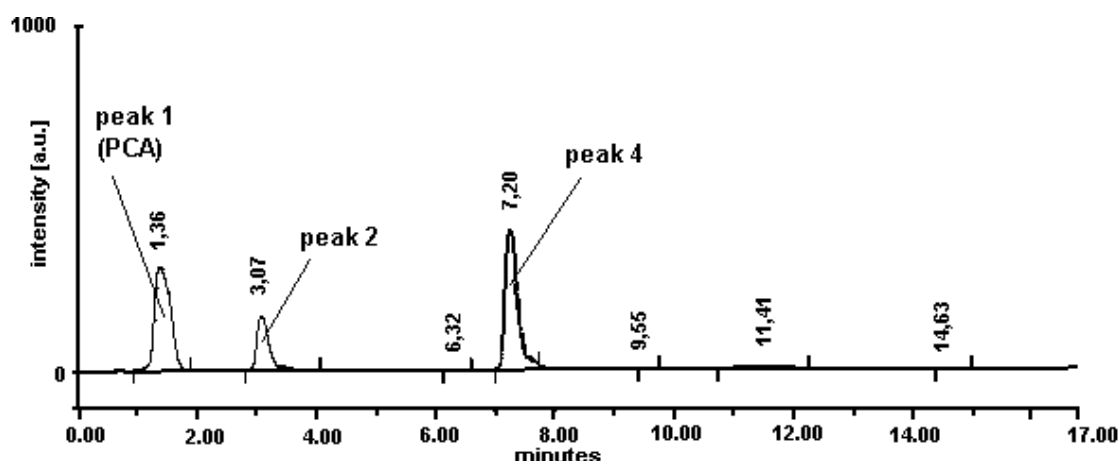


Abbildung 19: Chromatogramm des synthetisierten und durch SC gereinigten Anhydrids **10** nach Hydrolyse (60 min bei 40 °C in wäßriger Lösung, pH = 10).

Weitere Hinweise auf die Strukturen der den Peaks 1 bis 4 entsprechenden paramagnetischen Verbindungen wurden schließlich durch MS und $^1\text{H-NMR}$ erhalten (vgl. 3.1.3 und 3.1.4). Danach enthält, das bei der Synthese von PCA-Anhydrid **10** erhaltene Produktgemisch neben der Ausgangsverbindung **9** (PCA; Peak 1) und dem Syntheseprodukt **10** (PCA-Anhydrid; Peak 3) auch erhebliche Mengen an PCA-dicyclohexylharnstoff-amid (Peak 4) als Hauptnebenprodukt (vgl. Abbildung 20). Die Struktur einer weiteren ESR-aktiven Verbindung (Peak 2), die erheblich geringerer Menge auftritt, konnte bisher nicht geklärt werden.

Die hydrolytische Spaltung von Syntheseprodukt **10** unter den der HPLC adäquaten Bedingungen (siehe Abbildung 21) erfolgt wesentlich langsamer als die chromatographische Auftrennung, so daß davon auszugehen ist, daß **9** (PCA) im Produktgemisch hauptsächlich nicht umgesetzte Ausgangsverbindung repräsentiert.

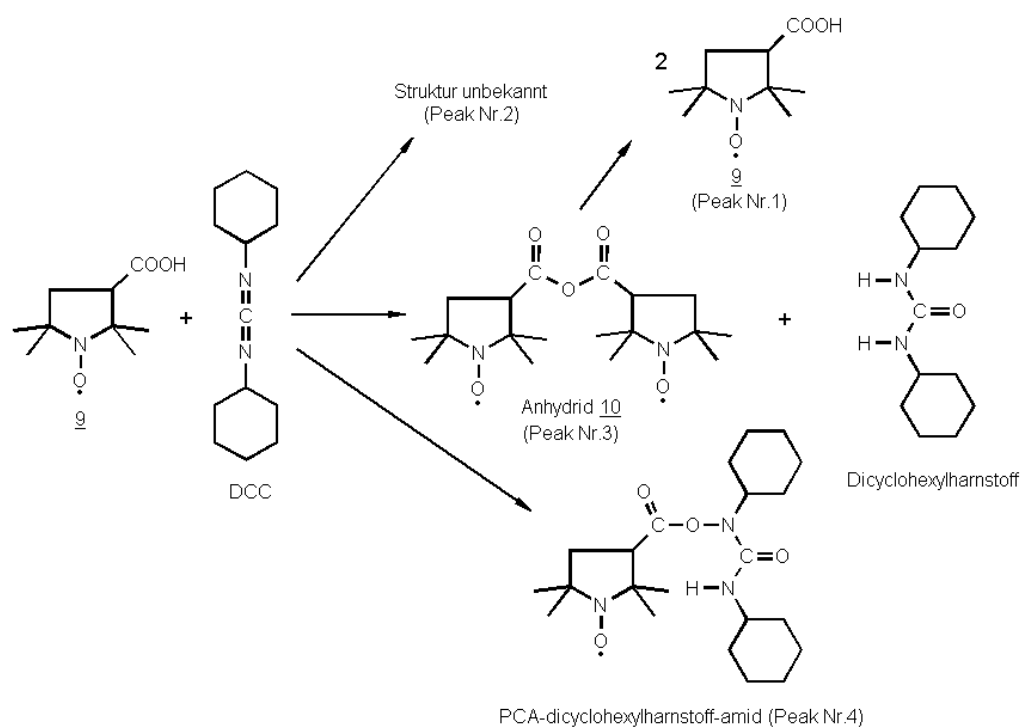


Abbildung 20: Mittels On-line HPLC-ESR-Kopplung nachgewiesenes Produktgemisch der PCA-Anhydrid-Synthese (10).

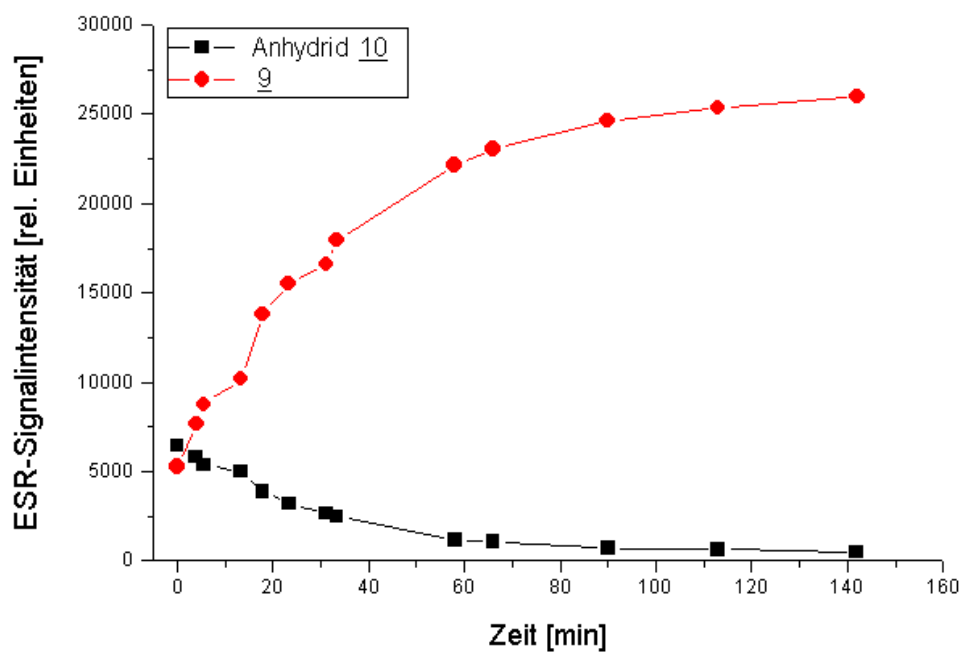


Abbildung 21: Hydrolytische Spaltung von PCA-Anhydrid (10) und Bildung von PCA (9) in wäßriger isotonischer Phosphatpufferlösung (pH 7, 25°C) gemessen als Abnahme bzw. Zunahme der ESR-Signalintensität.

Das vorliegende Beispiel zeigt, daß mit Hilfe der neuentwickelten On-line HPLC-ESR-Kopplung ein Gemisch paramagnetischer Verbindungen mit ähnlichen Hyperfeinaufspaltungen (a_N kaum unterscheidbar) analysiert werden kann. Damit wird der ESR-Spektroskopie eine neue Dimension bei der Untersuchung von organischen Radikalen erschlossen. Da sich die g -Werte der detektierten ESR-Signale der einzelnen Fraktionen sehr stark ähneln, wäre eine rechnerische Simulation allein aus dem ESR-Spektrum des Gemisches sehr problematisch bzw. nicht möglich.

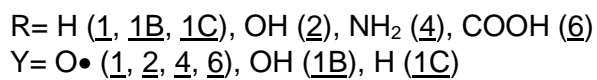
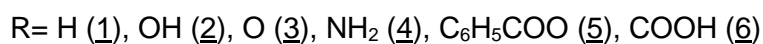
3.1.3 Massenspektrometrie (MS) und Gaschromatographie- Massenspektrometrie (GC-MS)-Kopplung

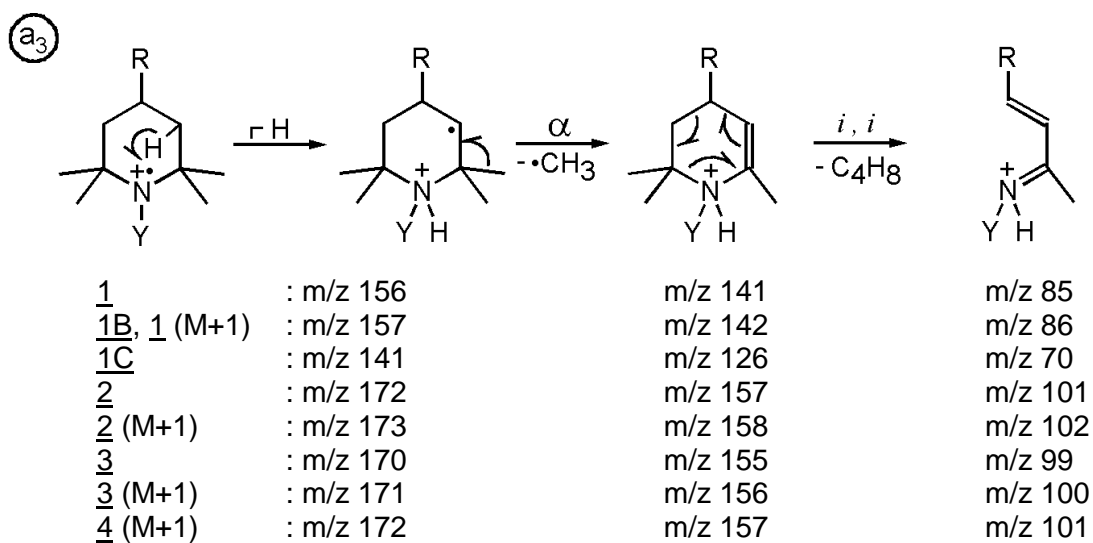
Als Grundlage für die Identifizierung und Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten bei den nachfolgenden Untersuchungen wurden die 70-eV-EI-Massenspektren verschiedener Referenzsubstanzen (1, 1B, 1C, 2-6, 9, 11-13) aufgenommen. Die Massenspektren wurden sowohl mit Direkteinlaßsystem, als auch nach vorhergehender gaschromatographischer Auftrennung (GC-MS-Kopplung) gemessen, wobei die GC-Kapillare direkt in ein Hewlett Packard 5989B Massenspektrometer mündete. Die Ionisierung erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe der Elektronenstoßionisation. Somit wurde für jeden separierten Peak ein komplettes Massenspektrum ohne Kontaminationen erhalten.

Für die Spektreninterpretation waren zusätzlich die von *Morrison und Davies* [40] sowie *Ivanovskaya et al.* [41] publizierten Ergebnisse hilfreich, die mit Hilfe der hochauflösenden MS einiger Piperidin- bzw. Imidazolinnitroxide mit unterschiedlichen Substituenten, z.T. unter Einbeziehung deuterierter Verbindungen, erhalten wurden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und unserer Befunde wird im folgenden der Versuch einer umfassenden Interpretation der Massenspektren, der von uns untersuchten Verbindungen unternommen. In unsere MS-Untersuchungen wurden neben den Piperidinnitroxiden mit unterschiedlichen 4-Substituenten auch einige Nitroxide der Pyrrol- und Imidazolgruppe miteinbezogen. Zusätzlich wurden als zu erwartende Reduktionsprodukte von 1 (TEMPO), das korrespondierende Hydroxylamin (1B, TEMPOH) und das sekundäre cyclische Amin 1C untersucht.

Piperidinderivate. Zunächst sollen die Massenspektren der untersuchten Tetramethylpiperidin-Derivate diskutiert werden. Diese sind mit entsprechenden Hinweisen auf die in Schema 1 vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismen in den Tabellen 4- 11 dargestellt.

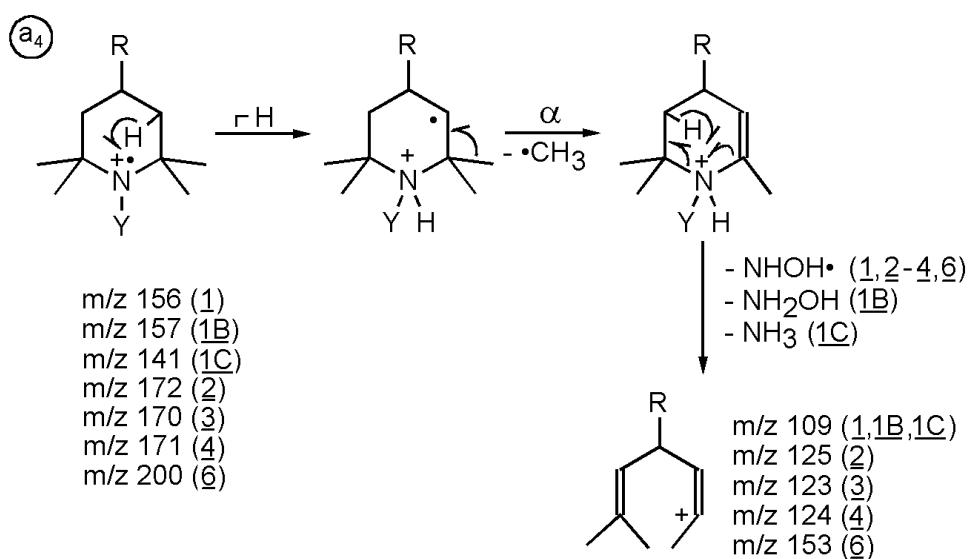
Bei der Formulierung der Fragmentierungen von Nitroxiden ist die Frage nach der Herkunft des bei der Elektronenstoßionisierung herausgeschlagenen Elektrons und der elektronischen Struktur des Molekülions dadurch bestimmt, daß die Ausgangsverbindungen als substituierte Derivate des elektronendefizienten Stickstoffmonoxids bereits ein ungepaartes Elektron besitzen. Dementsprechend ergeben sich für das Molekülion folgende Formulierungsmöglichkeiten.





R= H (1, 1B, 1C), OH (2), O (3), NH₂ (4)

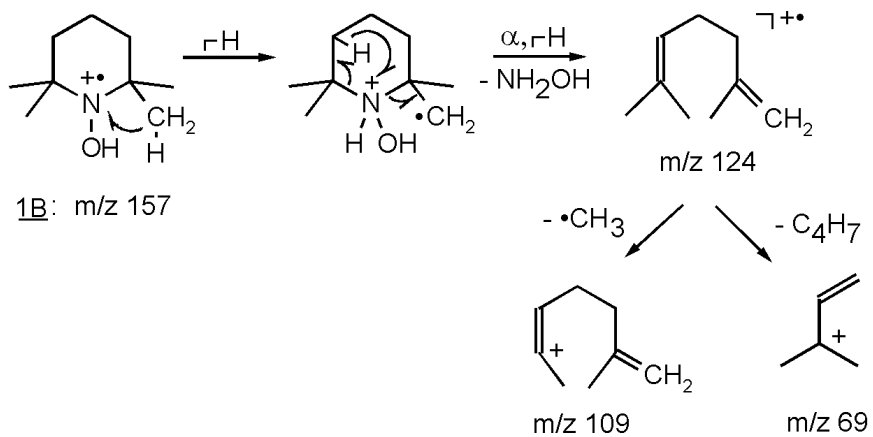
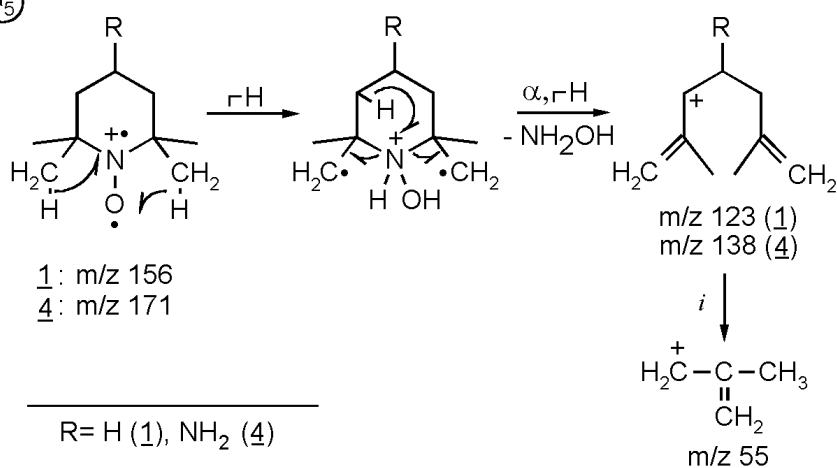
Y= O• (1, 2- 4), OH (1B), H (1C)

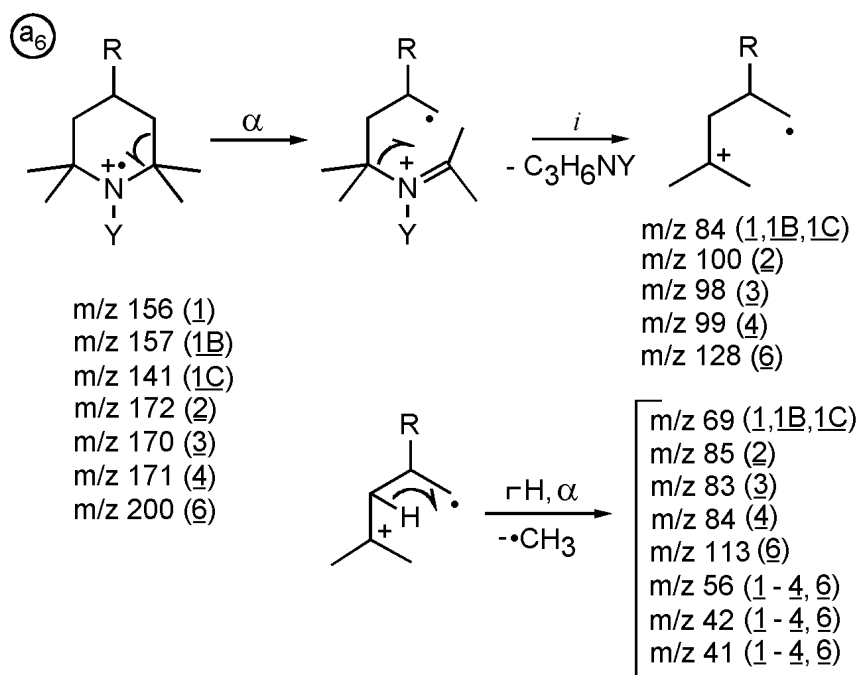


R= H (1, 1B, 1C), OH (2), O (3), NH₂ (4), COOH (6)

Y= O• (1, 2- 4, 6), OH (1B), H (1C)

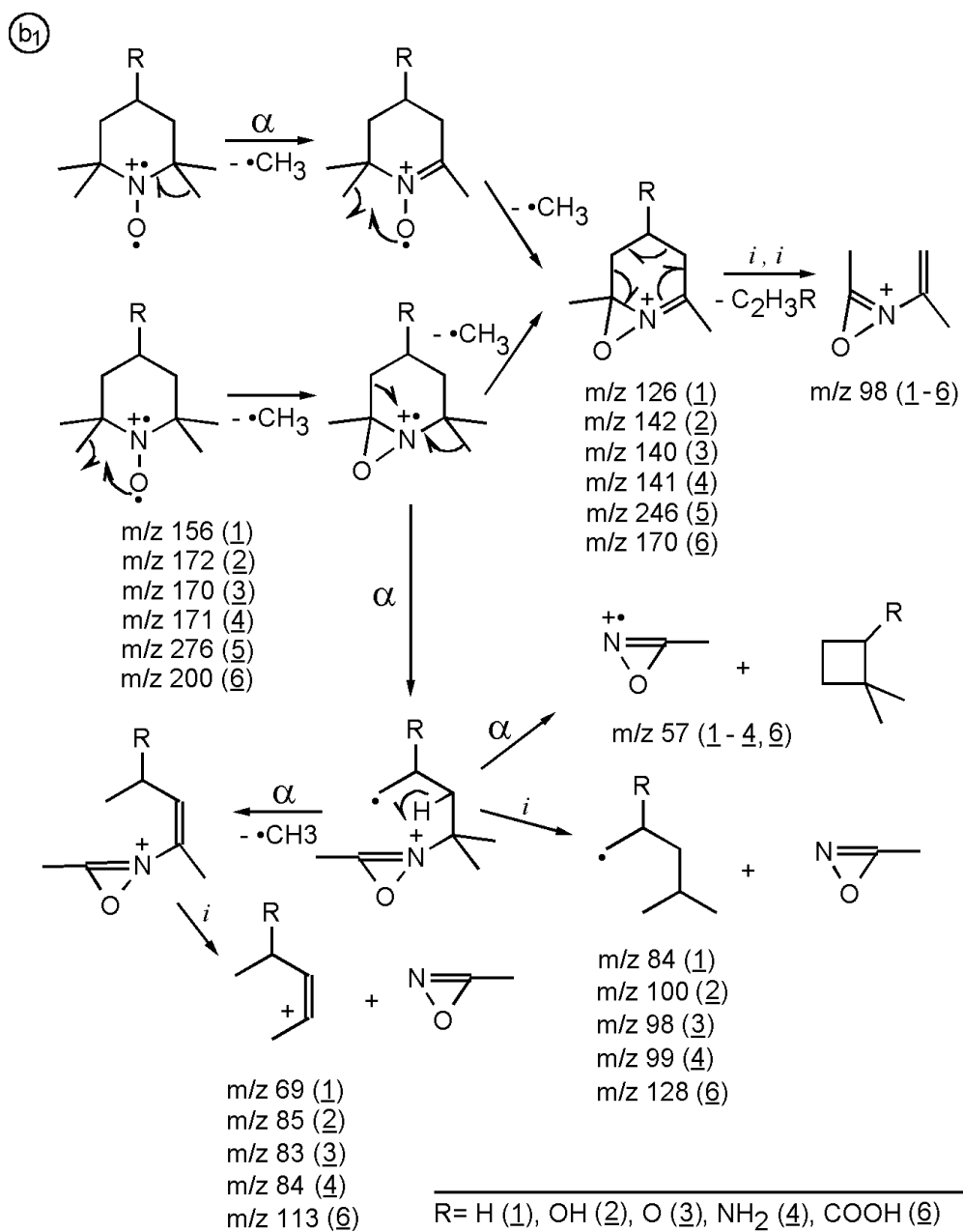
(a₅)

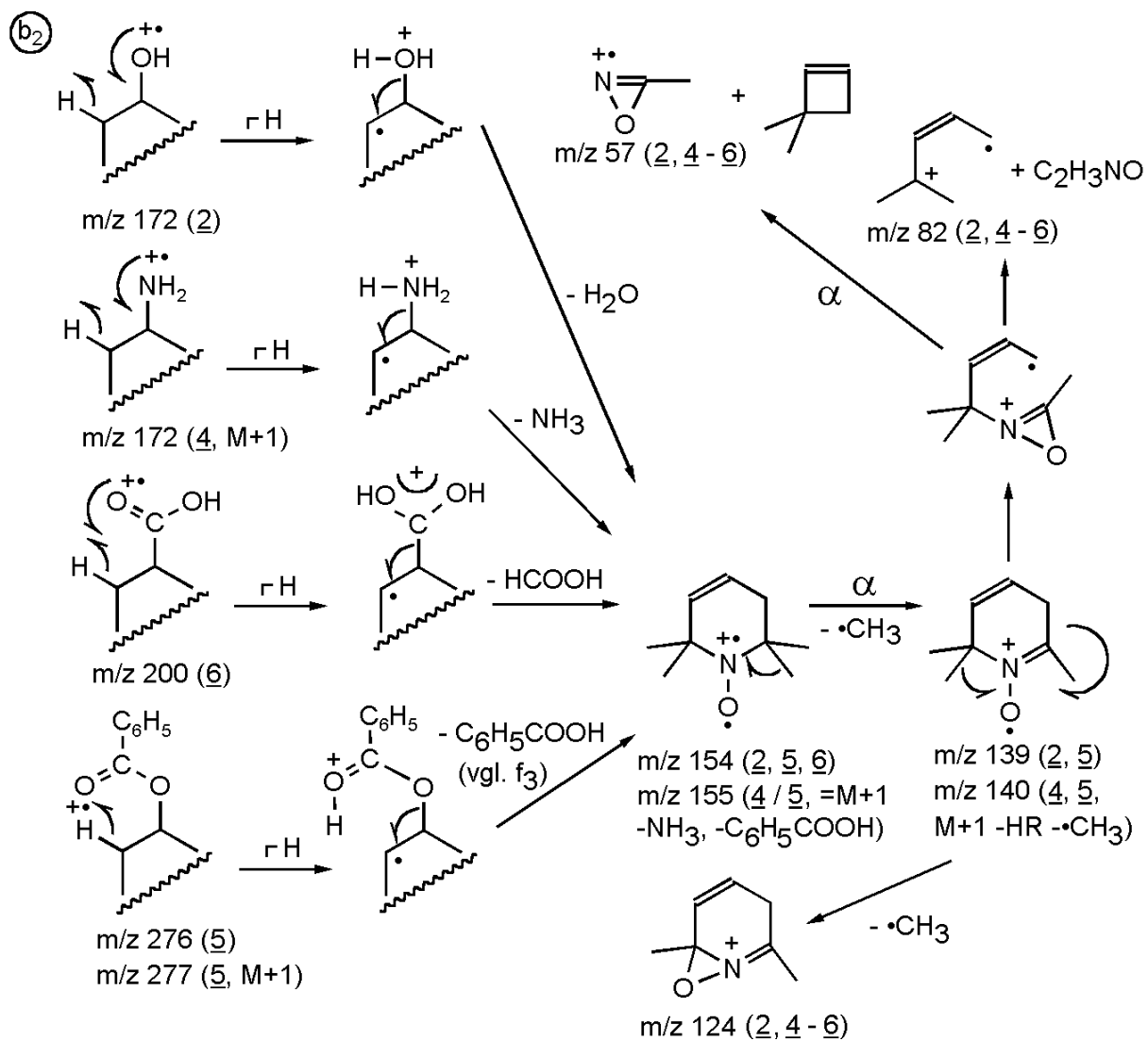


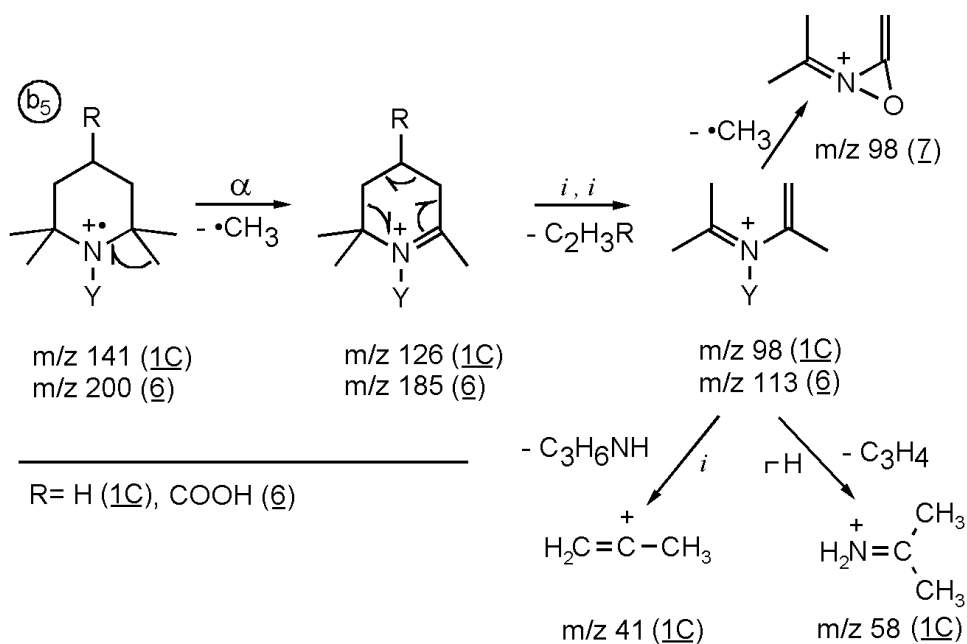
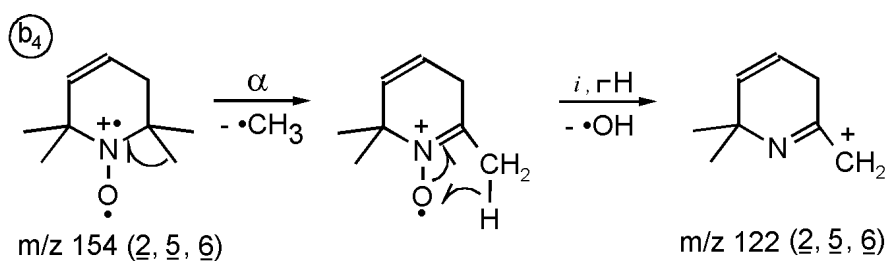
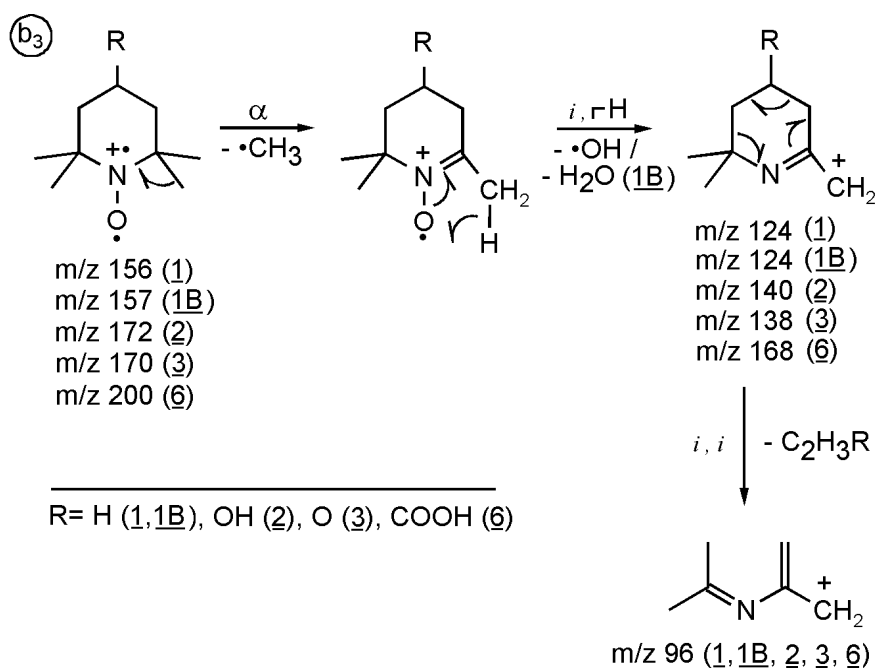


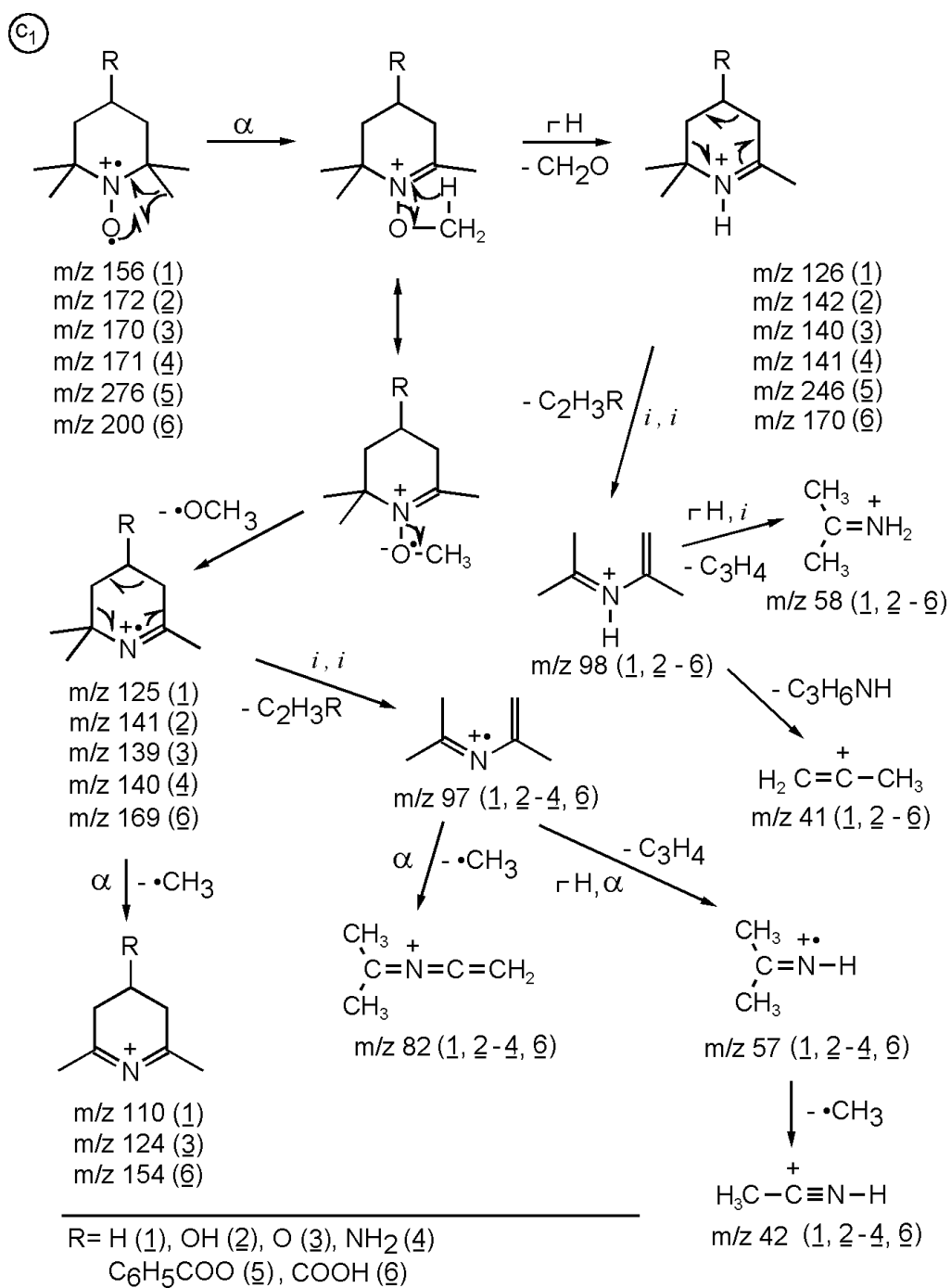
R= H (1, 1B, 1C), OH (2), O (3), NH₂ (4), COOH (6)

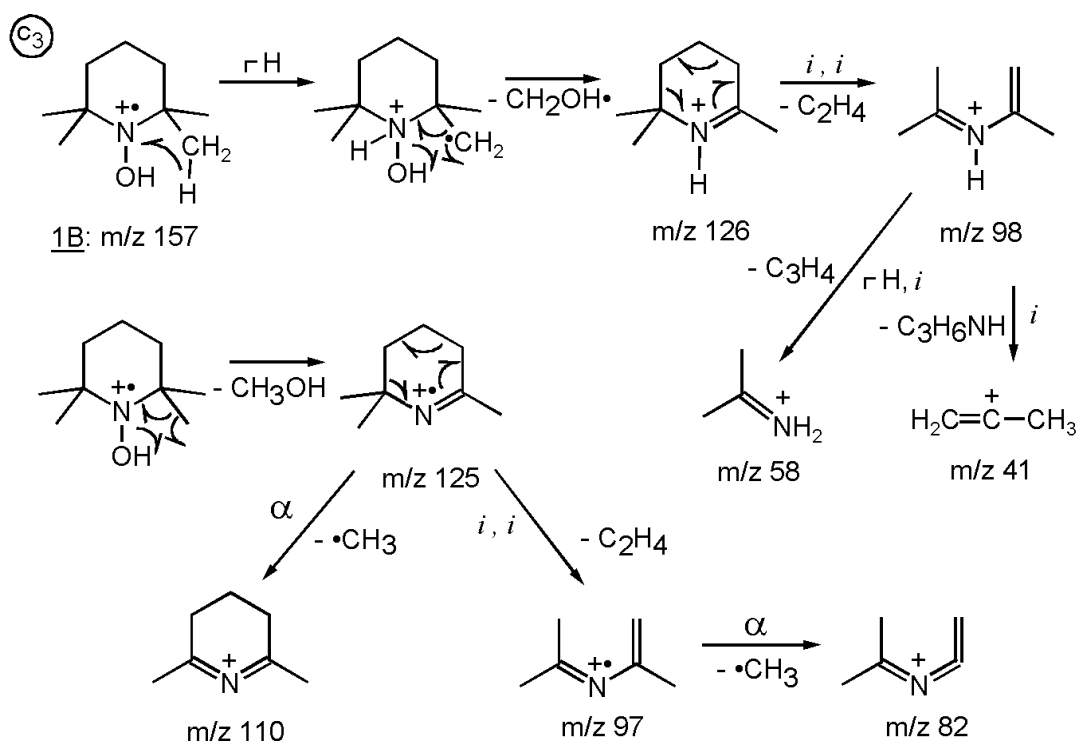
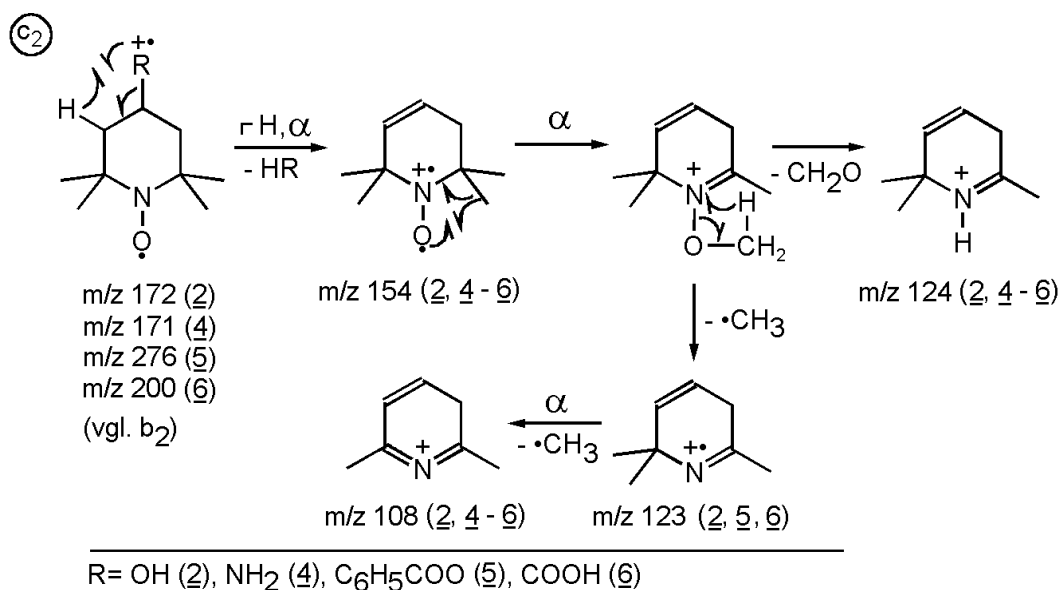
Y= O• (1, 2 - 4, 6), OH (1B), H (1C)

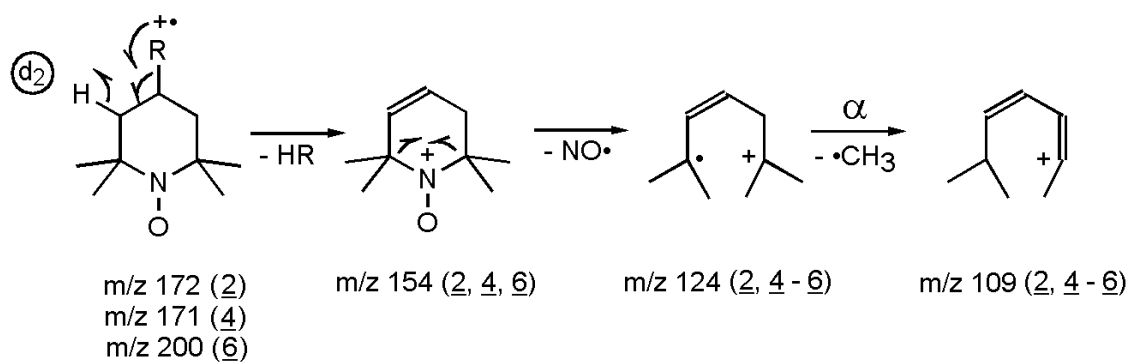
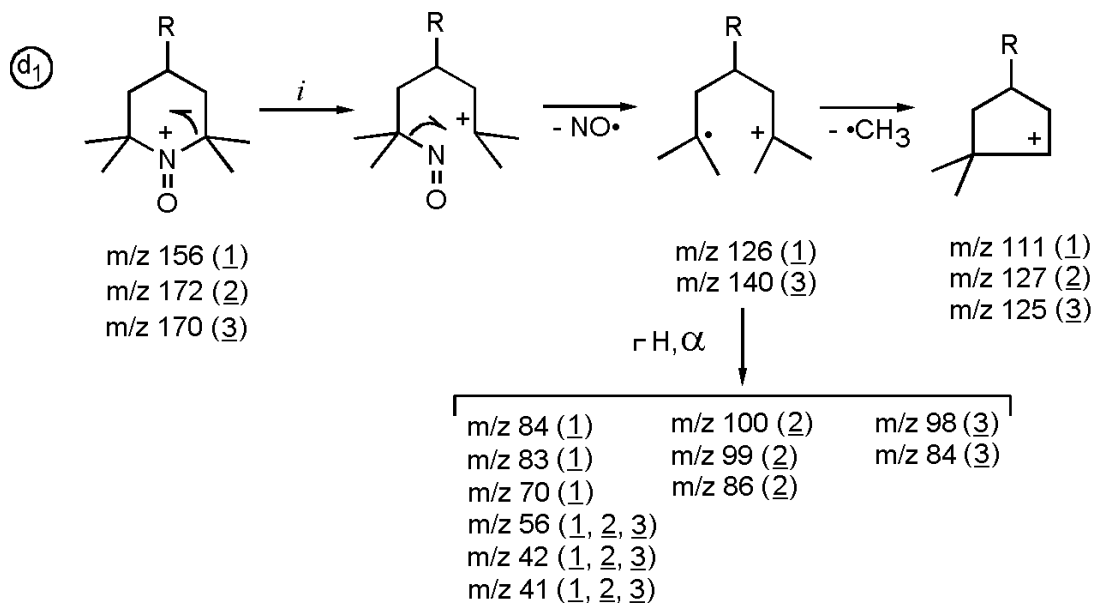




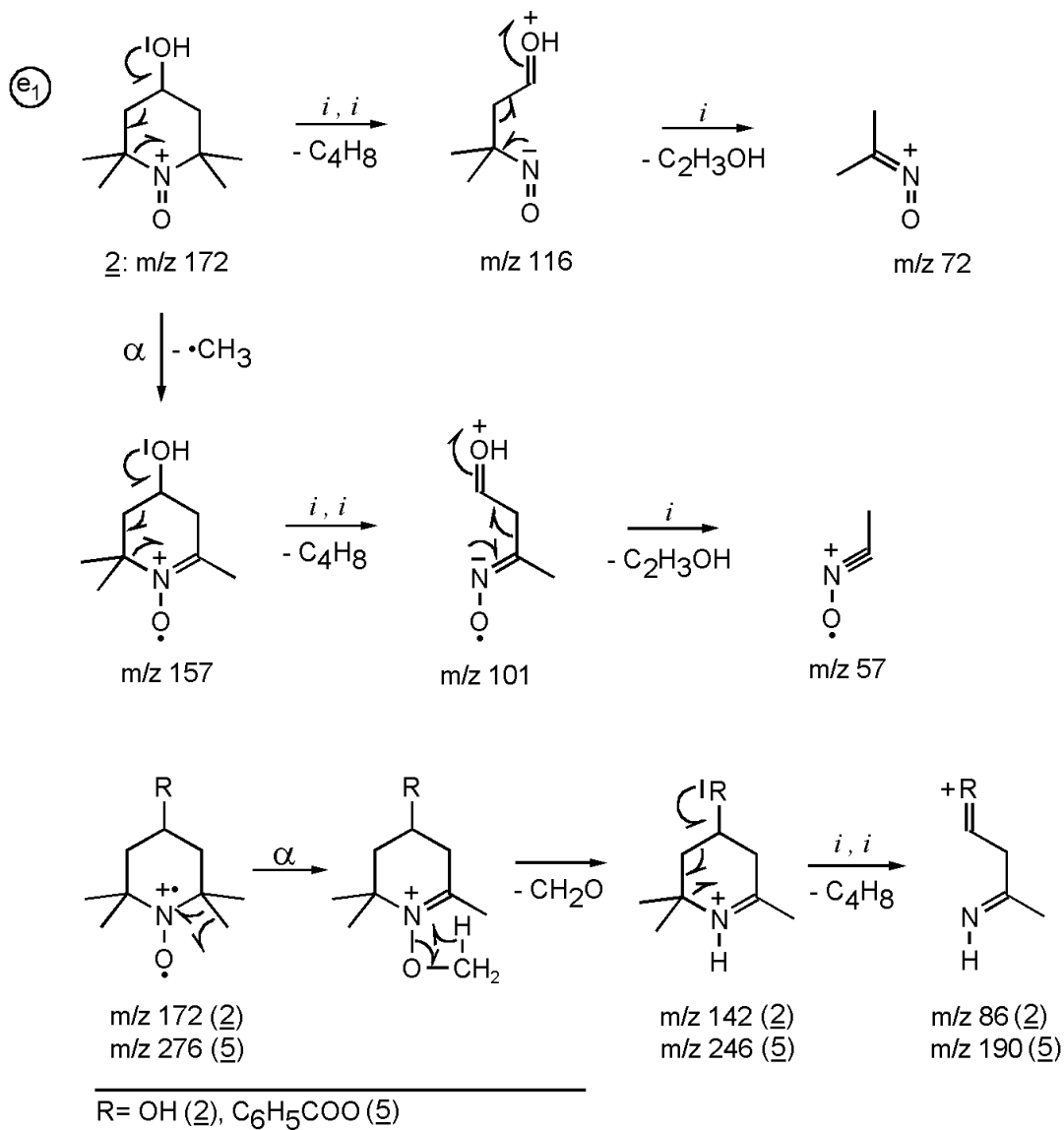


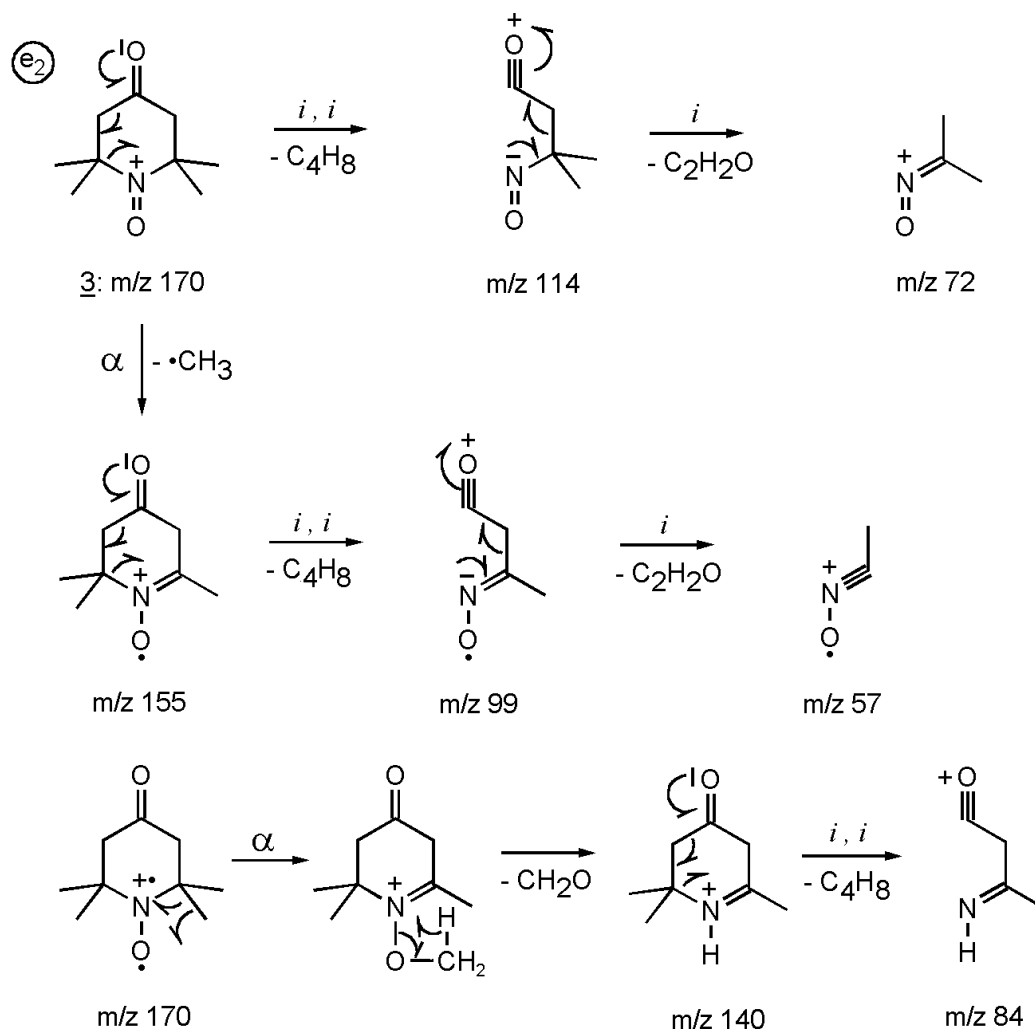


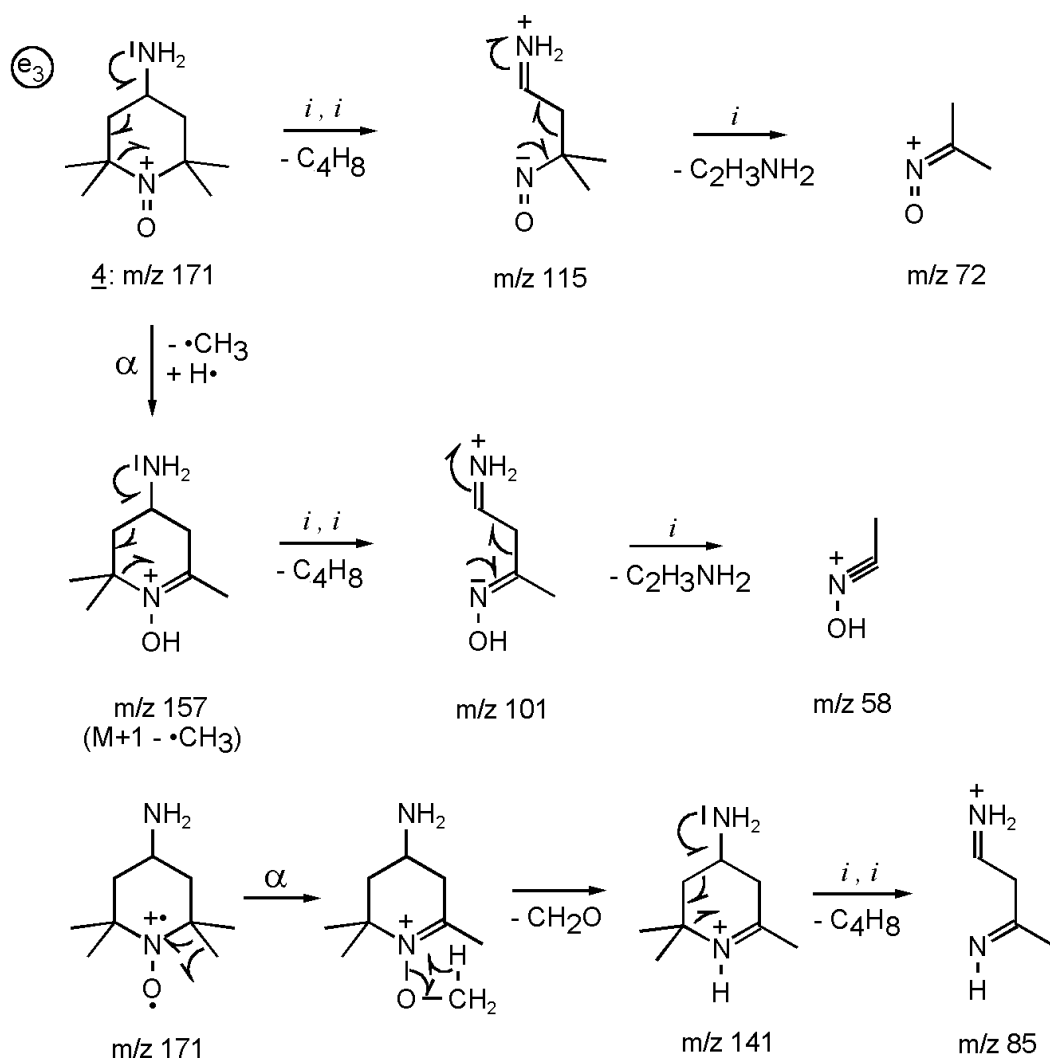


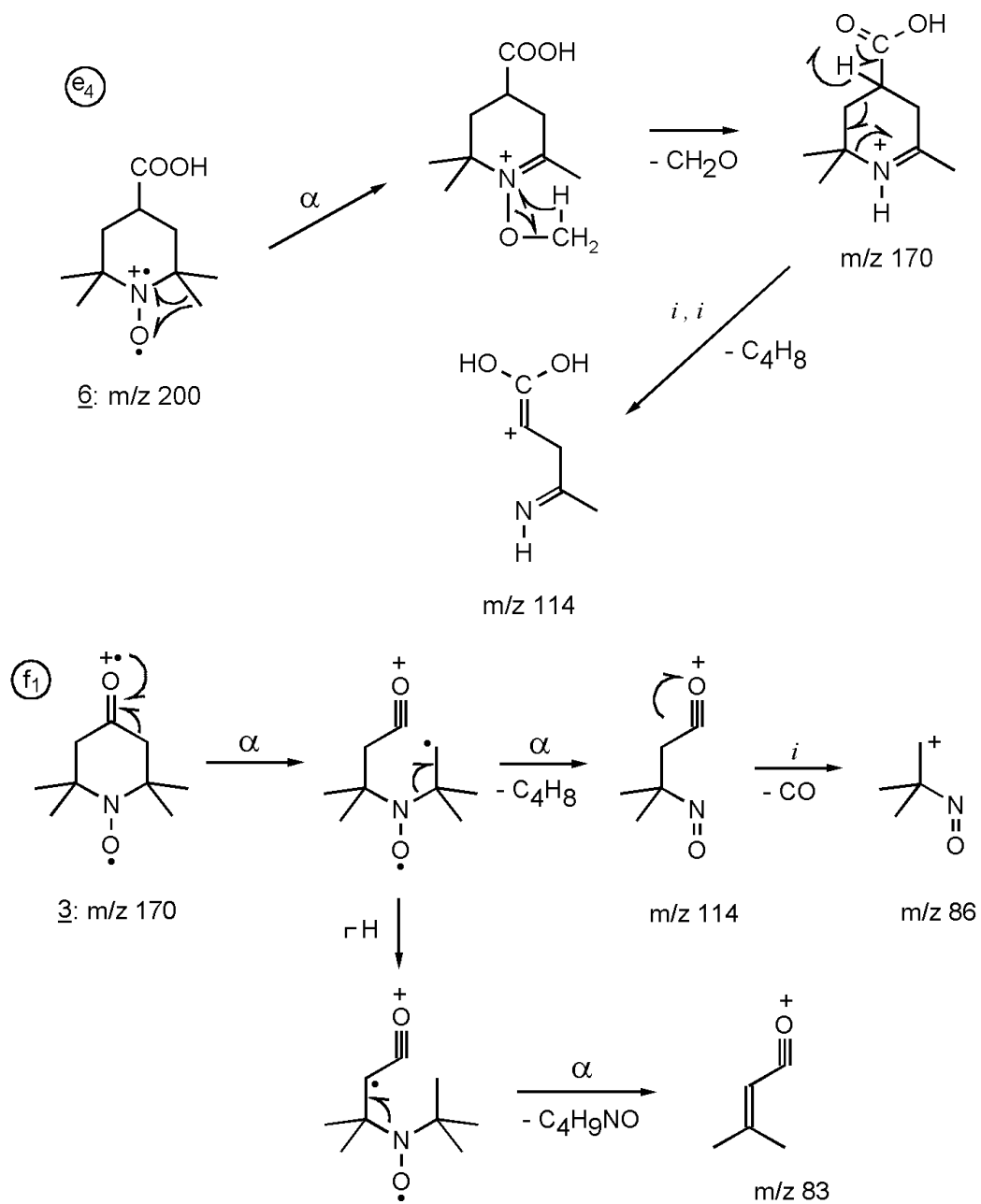


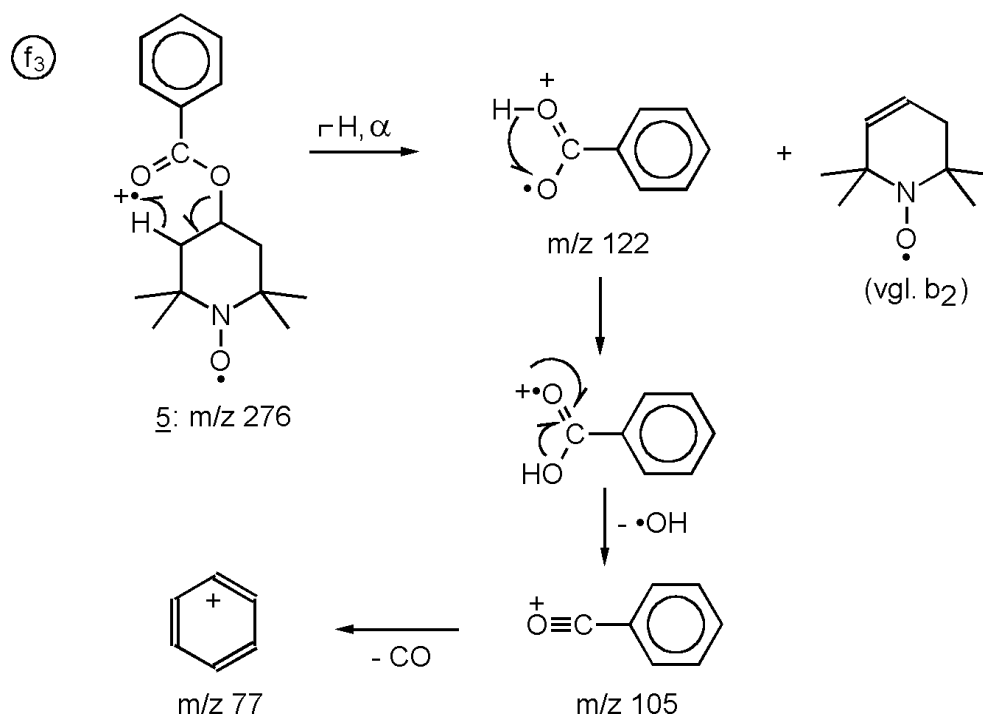
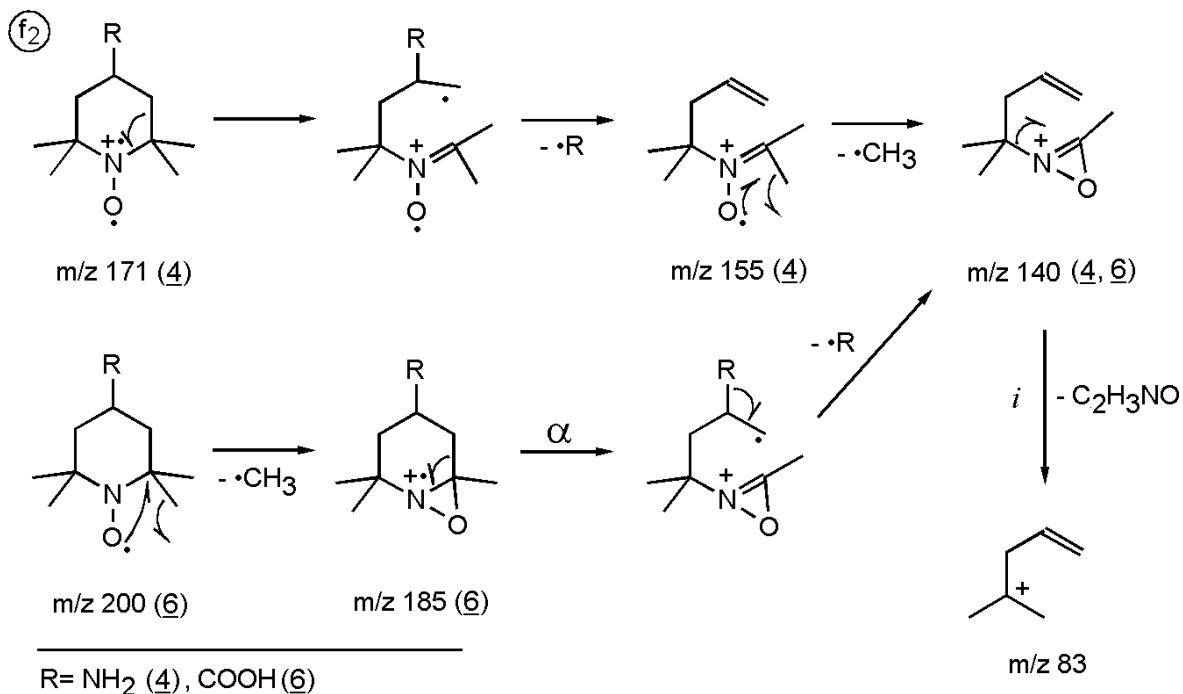
R = H (1), OH (2), O (3), NH₂ (4), C₆H₅COO (5), COOH (6)



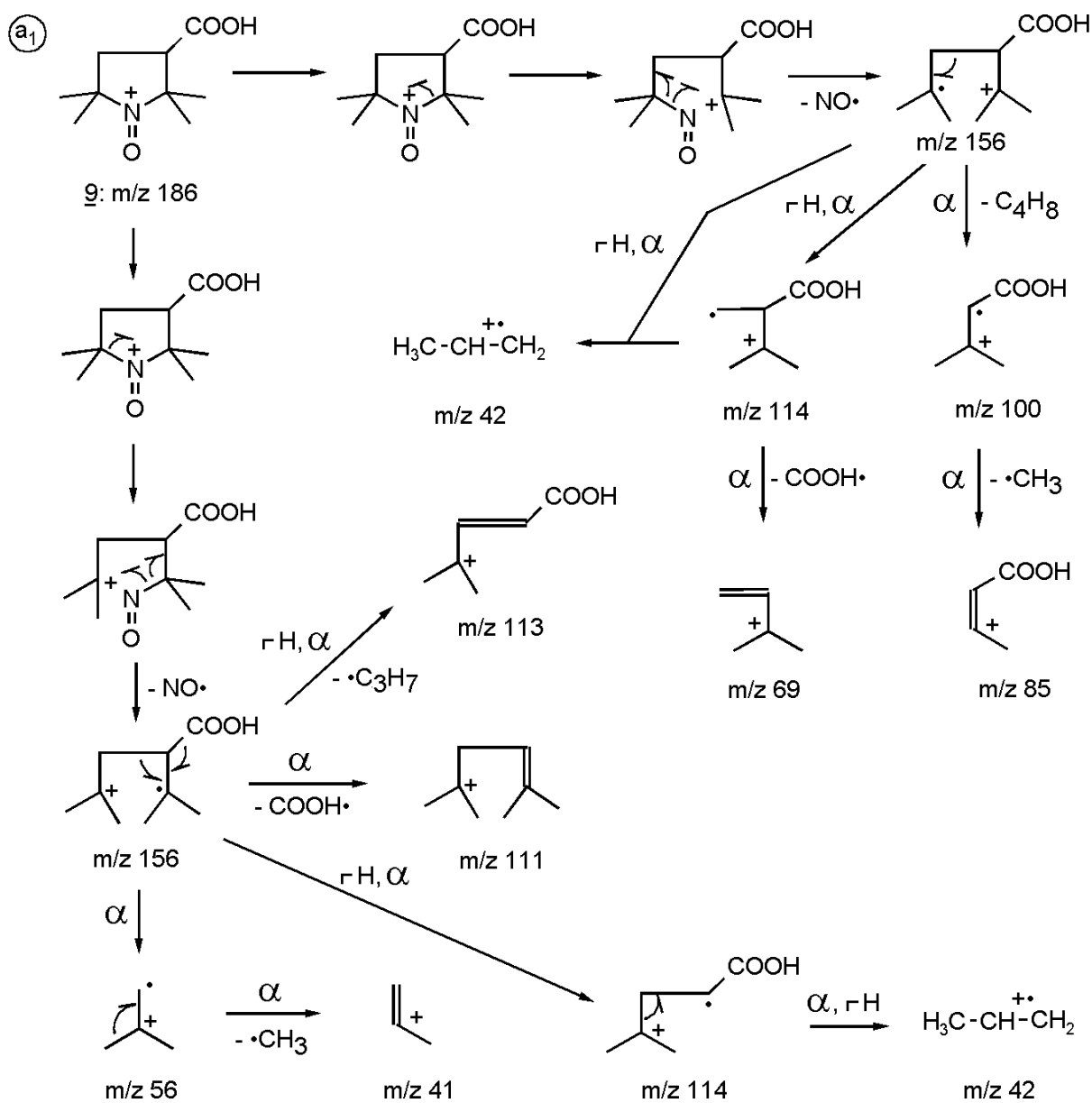


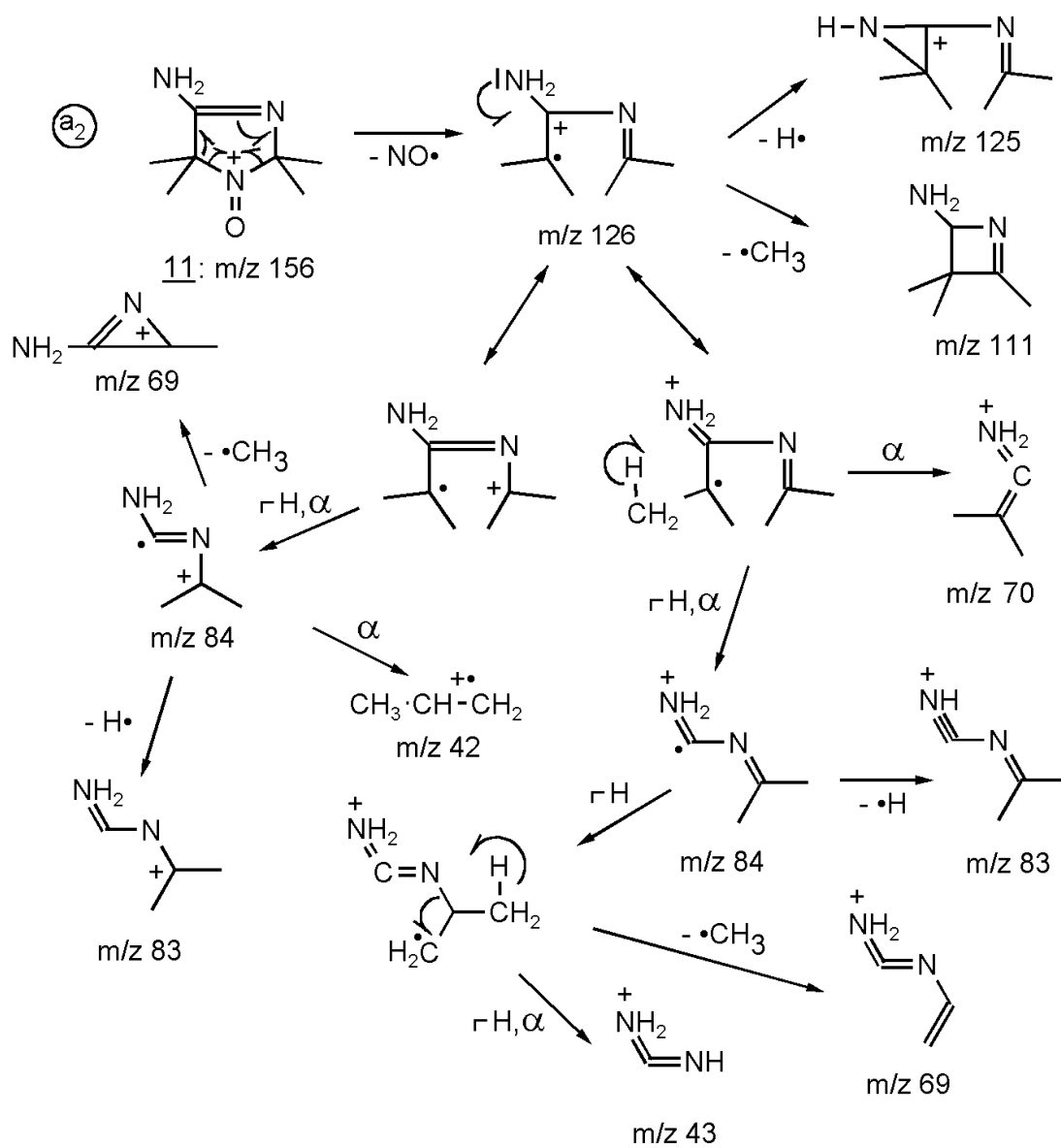


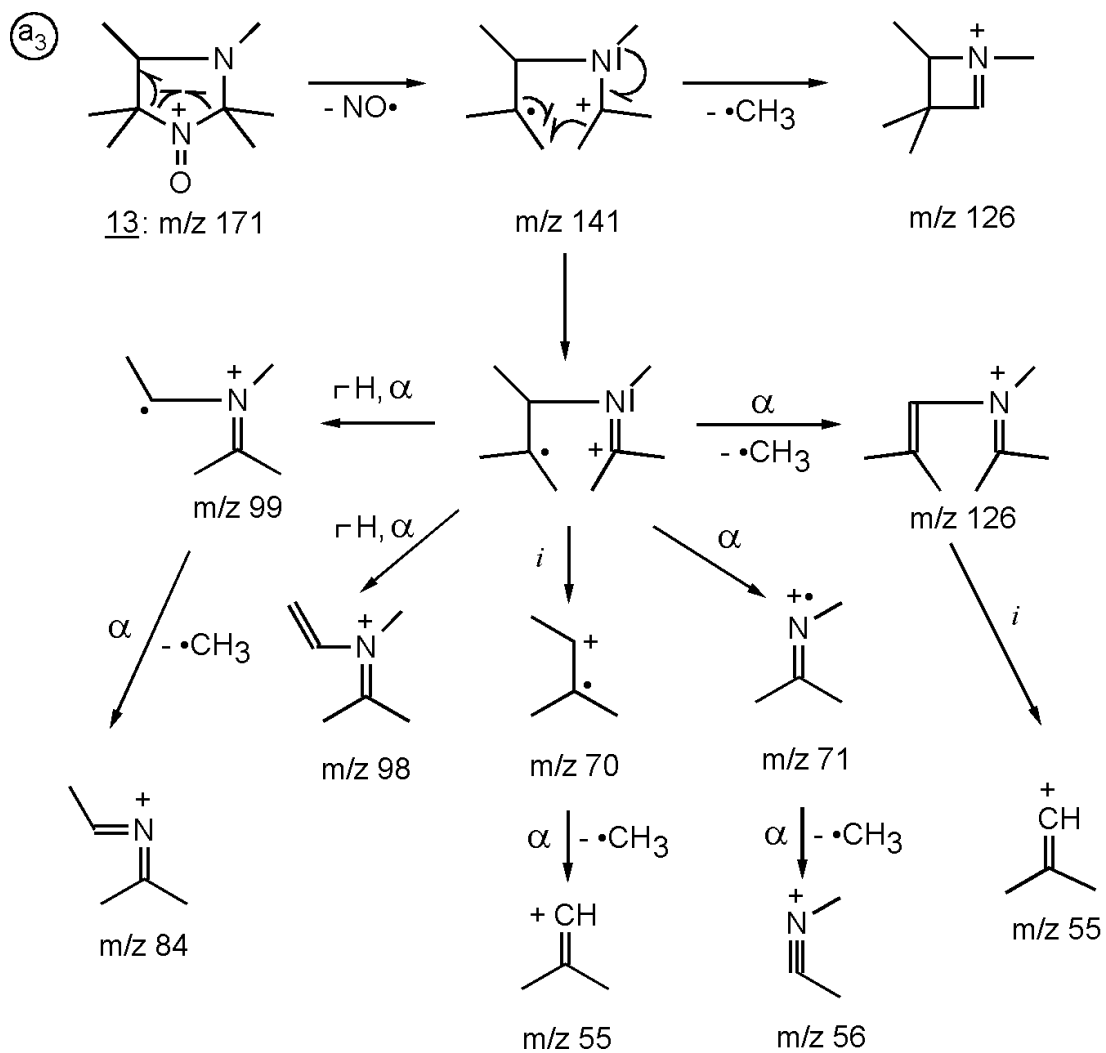


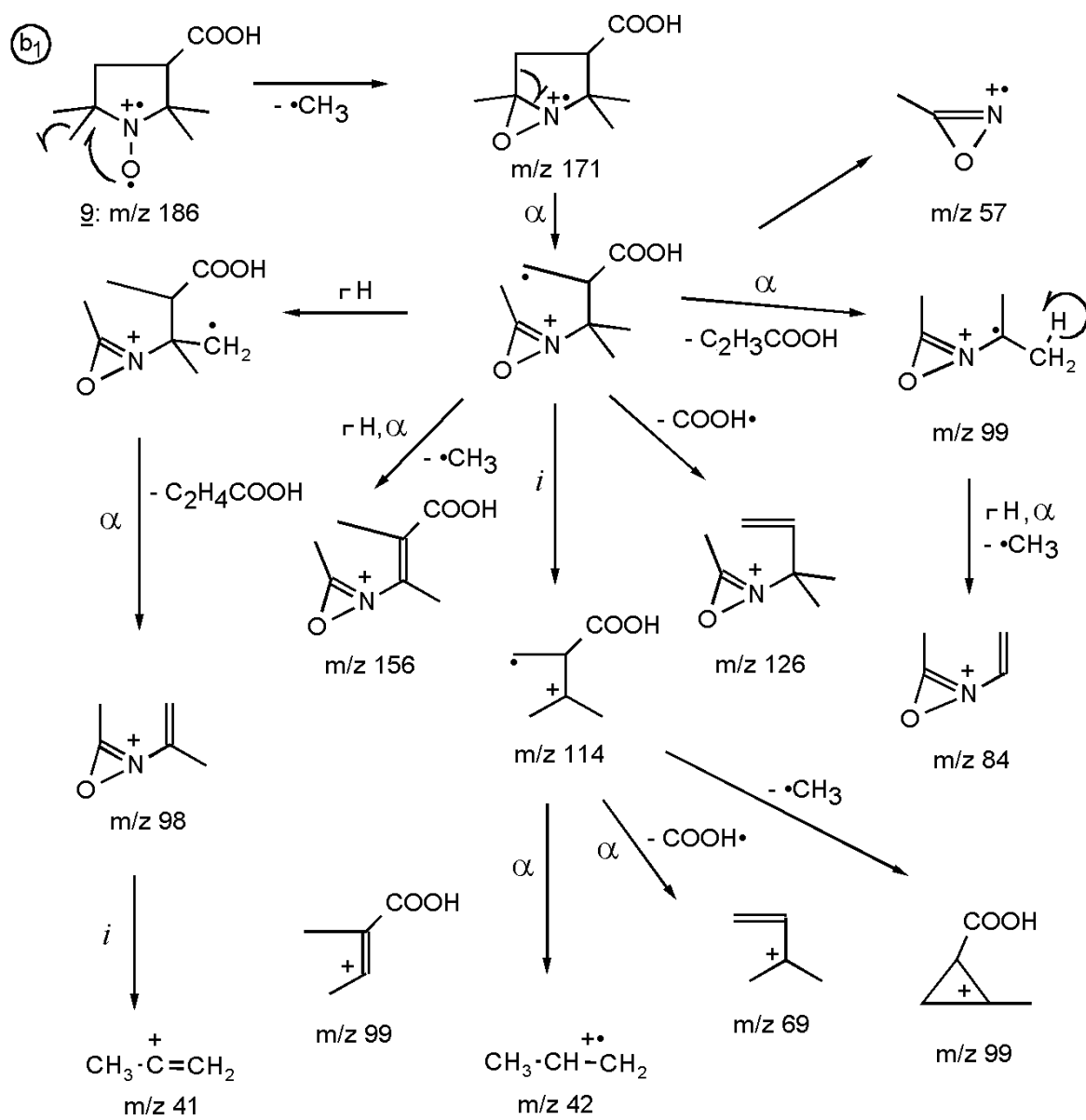


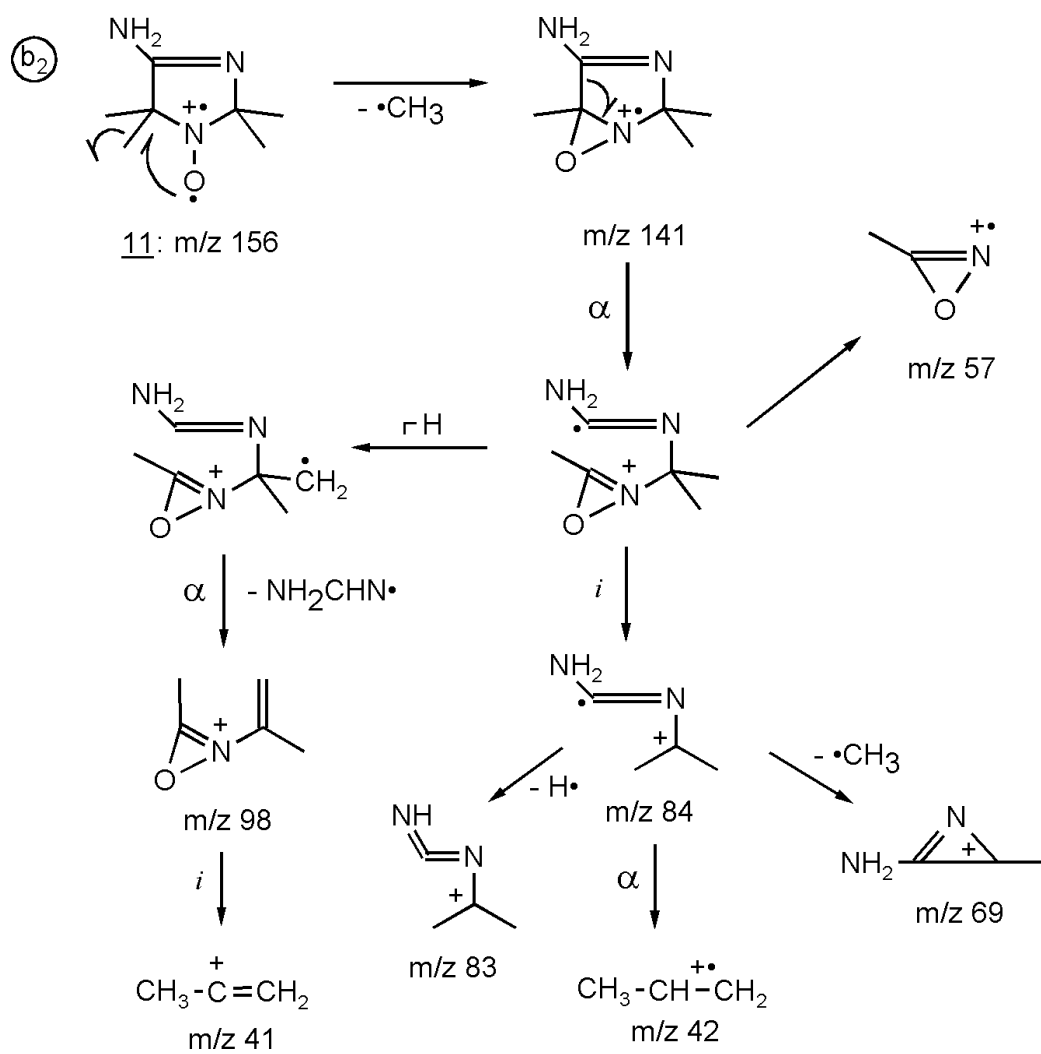
Schema 2: Fragmentierungswege der Fünfringnitroxide **9**, **11**- **13**.

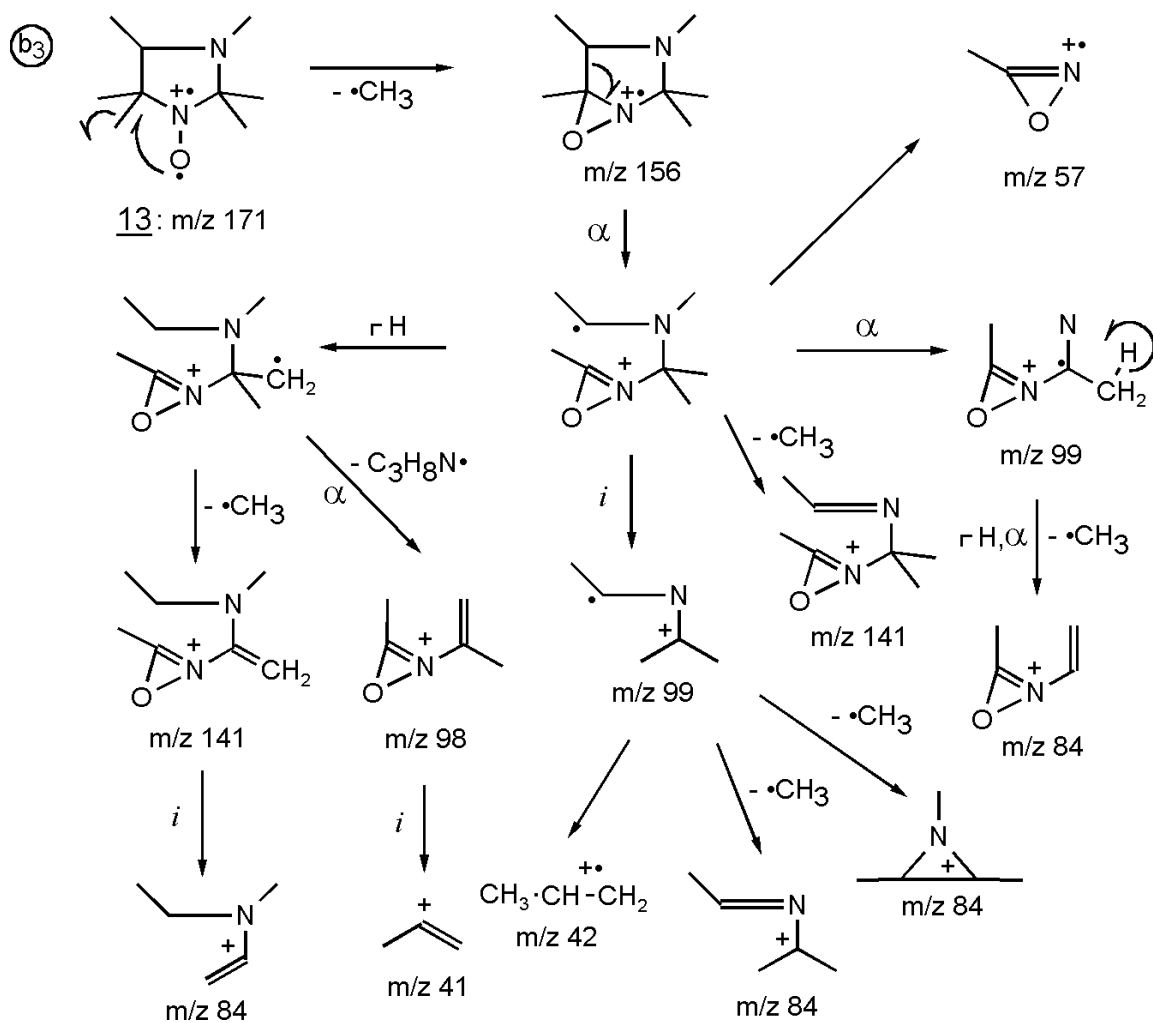


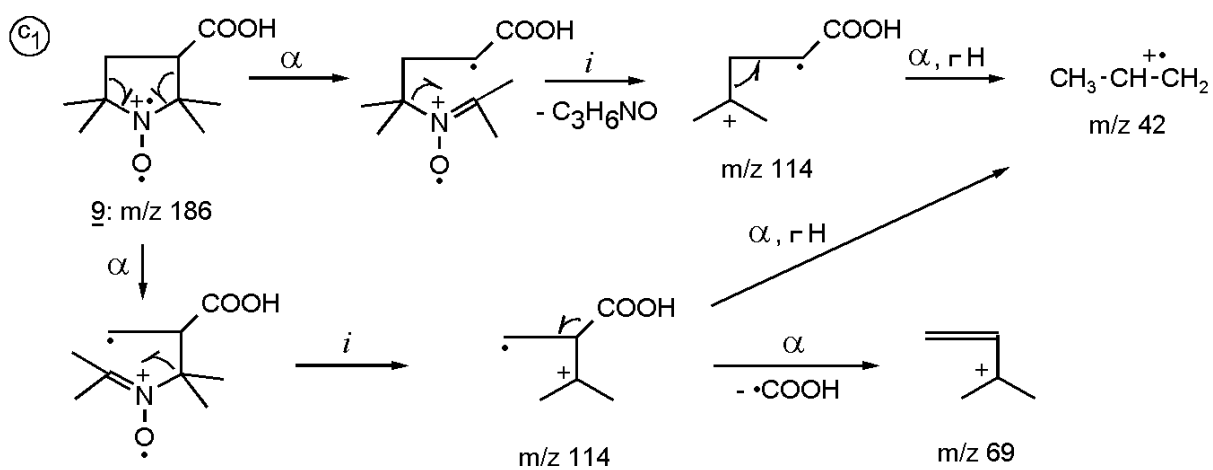
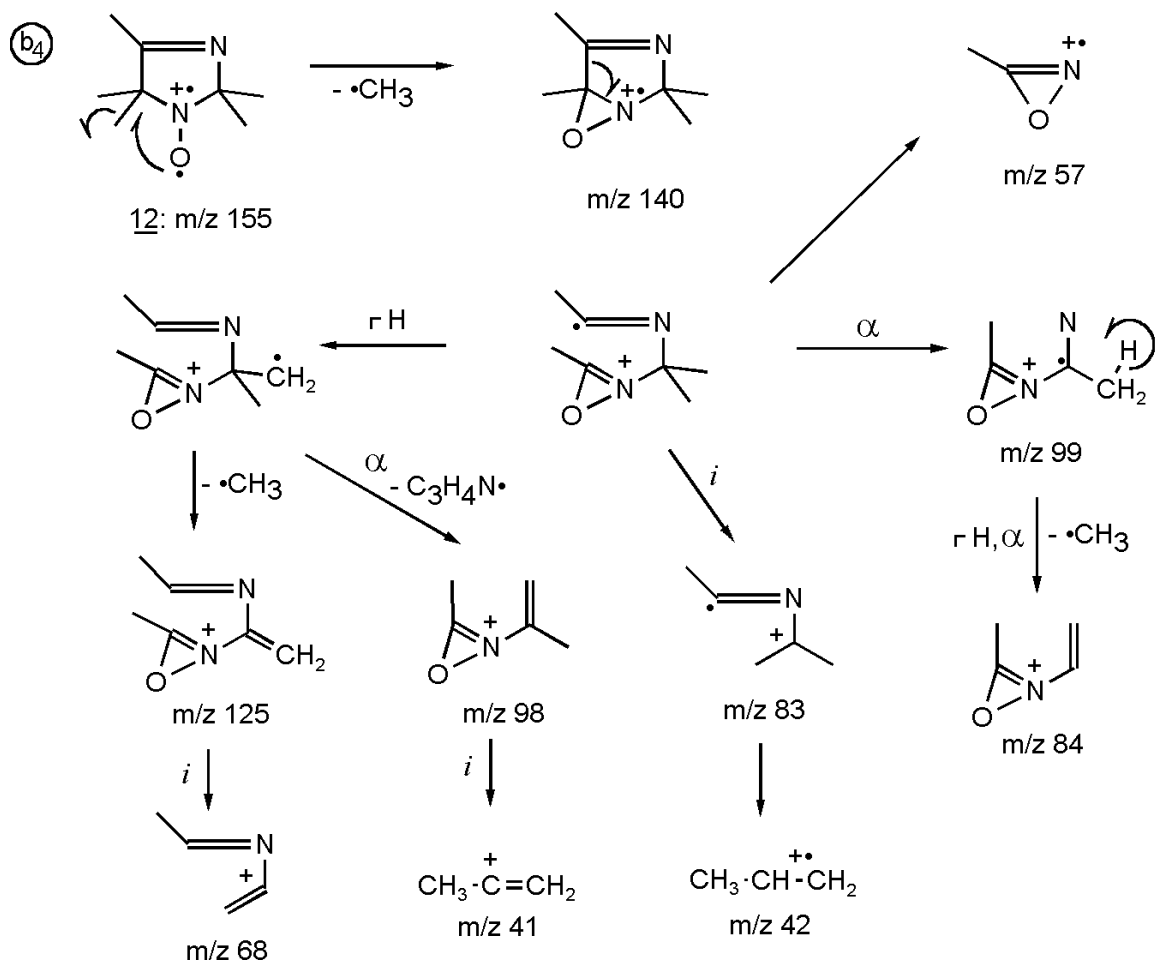


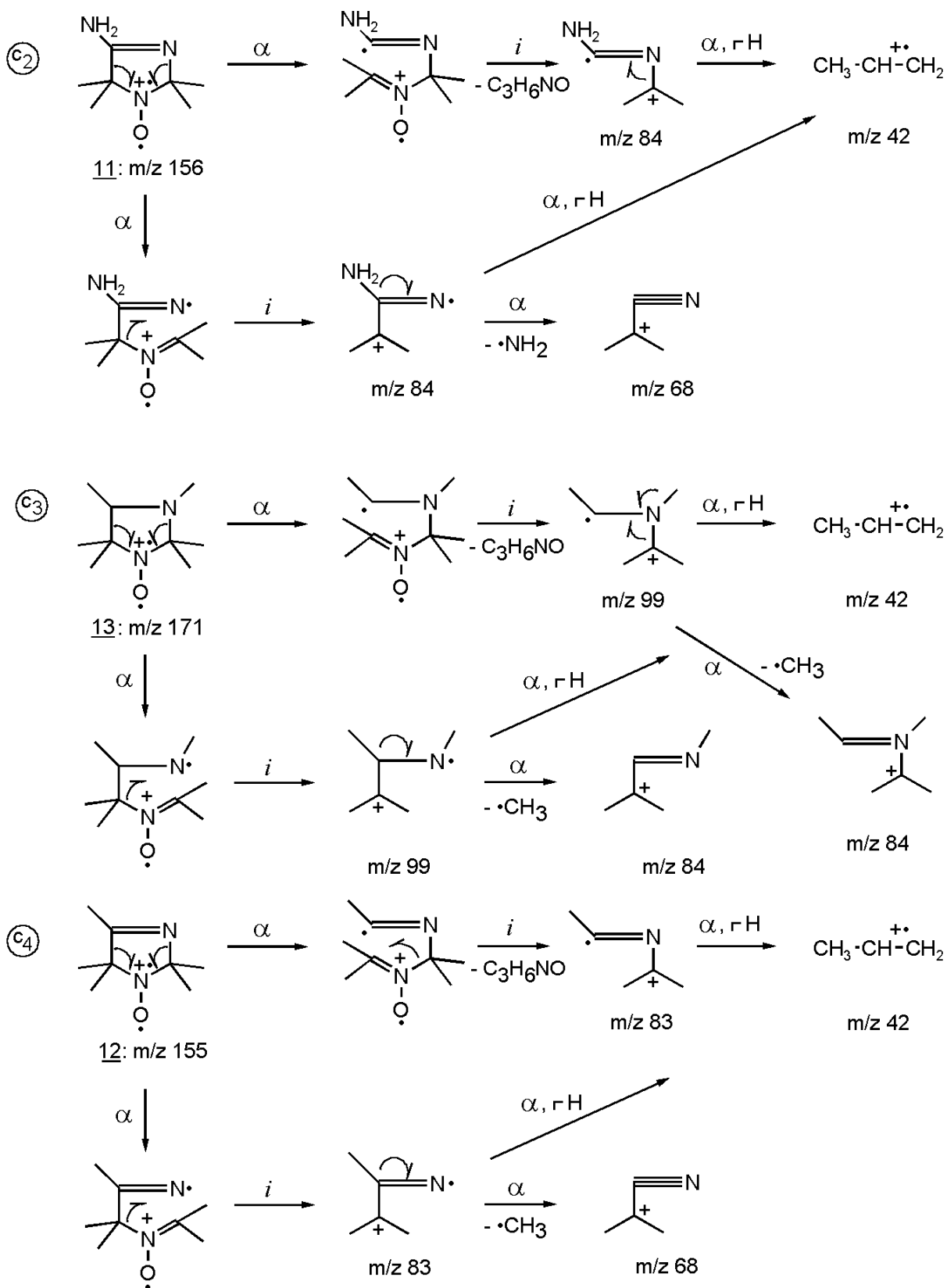


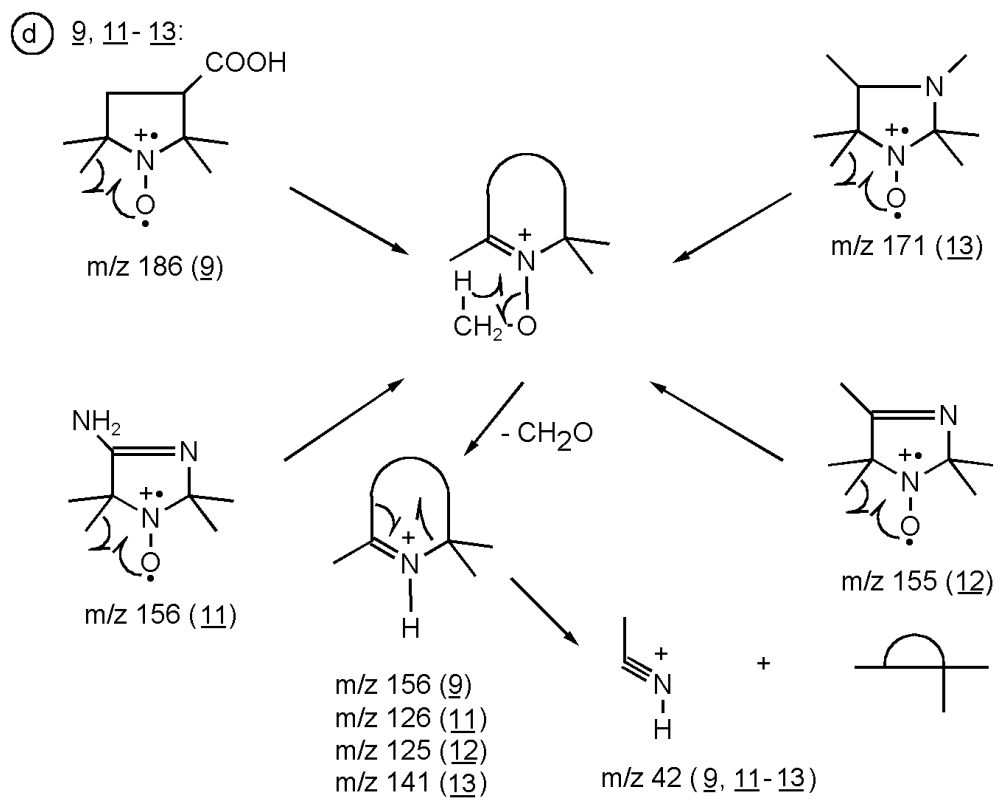












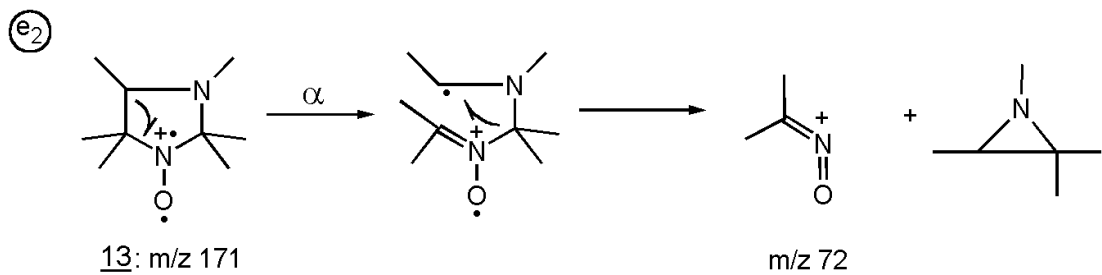
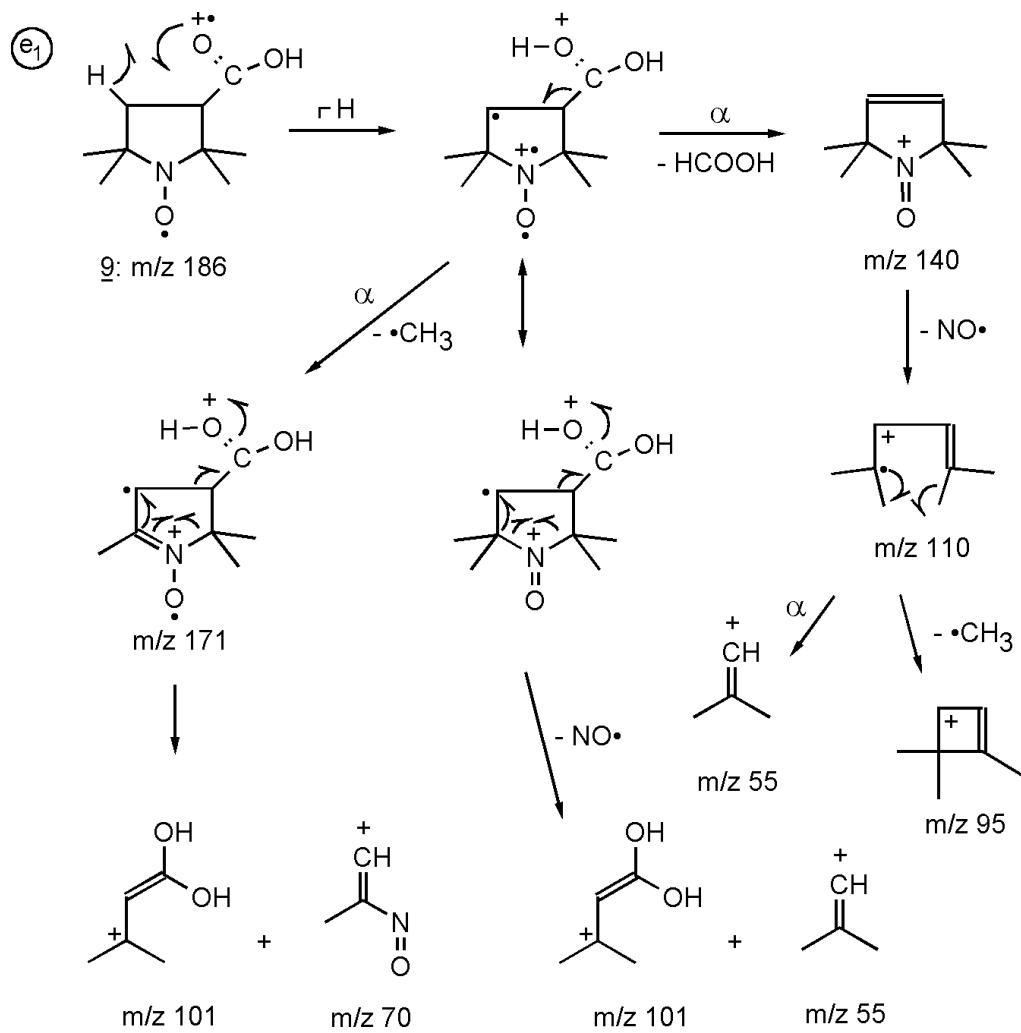


Tabelle 4: Massenspektrum von **1** (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
157	1	M + H ⁺ , a ₁	C ₉ H ₁₉ NO
156	10	M	C ₉ H ₁₈ NO
142	2	(M+1) - [•] CH ₃ , a ₁	C ₈ H ₁₆ NO
141	8	M - [•] CH ₃ , b ₁	C ₈ H ₁₅ NO
138	<1	M - H ₂ O	C ₉ H ₁₆ N
126	4	M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₁ M - CH ₂ O, c ₁ M - [•] NO, d ₁	C ₇ H ₁₂ NO C ₈ H ₁₆ N C ₉ H ₁₈
125	1	M - [•] OCH ₃ , c ₁	C ₈ H ₁₅ N
124	1	M - ([•] CH ₃ + [•] OH), b ₃	C ₈ H ₁₄ N
123	3	M - NH ₂ OH, a ₅	C ₉ H ₁₅
114	2	M - (C ₃ H ₅ [•] + H ⁺), a ₂ M - C ₃ H ₆ , a ₂	C ₆ H ₁₂ NO
111	1	M - (NO [•] + [•] CH ₃), d ₁	C ₈ H ₁₅
110	1	M - ([•] OCH ₃ + [•] CH ₃), c ₁	C ₇ H ₁₂ N
109	2	M - ([•] CH ₃ + NHOH [•]), a ₄	C ₈ H ₁₃
98	2	M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃ + C ₂ H ₄), b ₁ M - (CH ₂ O + C ₂ H ₄), c ₁	C ₅ H ₈ NO C ₆ H ₁₂ N
97	1	M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₄), c ₁	C ₆ H ₁₁ N
96	2	M - ([•] CH ₃ + [•] OH + C ₂ H ₄), b ₃	C ₆ H ₁₀ N
88	<1		C ₄ H ₁₀ NO
86	2	(M+1) - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈), a ₃	C ₄ H ₈ NO
85		M - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈), a ₃	C ₄ H ₇ NO
84	4	M - C ₃ H ₆ NO, a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₁ M - (NO [•] + C ₃ H ₆), d ₁	C ₆ H ₁₂
83	4	M - C ₃ H ₆ NHO [•] M - (CH ₂ O + C ₂ H ₄ + [•] CH ₃), c ₁ M - (NO [•] + C ₃ H ₇ [•]), d ₁	C ₆ H ₁₁ C ₅ H ₉ N C ₆ H ₁₁
82	3	M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₄ + [•] CH ₃), c ₁	C ₅ H ₈ N
81	12		C ₆ H ₉
74	14	(M+1) - C ₆ H ₁₁ [•] , a ₂	C ₃ H ₈ NO
73	7	M - C ₆ H ₁₁ [•] , a ₂	C ₃ H ₇ NO
70	24	M - (NO [•] + C ₄ H ₈), d ₁	C ₅ H ₁₀
69	66	M - (C ₃ H ₆ NO + [•] CH ₃), a ₆	C ₅ H ₉
58	4	M - (CH ₂ O + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₄), c ₁	C ₃ H ₈ N
57	16	M - ([•] CH ₃ + C ₆ H ₁₂), b ₁ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₄), c ₁	C ₂ H ₃ NO C ₃ H ₇ N
56	71	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₂ H ₄), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₂ H ₄), a ₆ M - (NO [•] + C ₅ H ₁₀), d ₁	C ₄ H ₈
55	63	M - (NH ₂ OH + C ₅ H ₈), a ₅	C ₄ H ₇
43	21		-
42	29	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₃ H ₆), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₆), b ₁ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₄ + [•] CH ₃), c ₁ M - (NO [•] + C ₆ H ₁₂), d ₁	C ₃ H ₆ C ₂ H ₄ N C ₃ H ₆
41	100	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₃ H ₇), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₇), b ₁ M - (CH ₂ O + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₆ NH), c ₁	C ₃ H ₅

		M - (NO [•] + C ₆ H ₁₃), d ₁	
--	--	--	--

¹ m/z 41= 100%**Tabelle 5:** Massenspektrum von **1B** (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
157	1	M	C ₉ H ₁₉ NO
156	10	M - H [•]	C ₉ H ₁₈ NO
143	9	M - [•] CH ₃ + 1, Isotopenpeak	-
142	100	M - [•] CH ₃ , a ₃	C ₈ H ₁₆ NO
126	8	M - [•] CH ₂ OH, c ₃	C ₈ H ₁₆ N
125	1	M - CH ₃ OH, c ₃	C ₈ H ₁₅ N
124	2	M - NH ₂ OH, a ₅	C ₉ H ₁₆
		M - ([•] CH ₃ + H ₂ O), b ₃	
110	4	M - (CH ₃ OH + [•] CH ₃), c ₃	C ₇ H ₁₂ N
109	29	M - ([•] CH ₃ + NH ₂ OH), a ₄	C ₈ H ₁₃
		M - (NH ₂ OH + [•] CH ₃), a ₅	
98	6	M - ([•] CH ₂ OH + C ₂ H ₄), c ₃	C ₆ H ₁₂ N
97	1	M - (CH ₃ OH + C ₂ H ₄), c ₃	C ₆ H ₁₁ N
96	3	M - ([•] CH ₃ + H ₂ O + C ₂ H ₄), b ₃	C ₆ H ₁₀ N
86	14	M - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈), a ₃	C ₄ H ₈ NO
84	4	M - C ₃ H ₆ NOH, a ₆	C ₆ H ₁₂
82	5	M - (CH ₃ OH + C ₂ H ₄ + [•] CH ₃), c ₃	C ₅ H ₈ N
81	3		C ₆ H ₉
74	31	M - C ₆ H ₁₁ [•] , a ₂	C ₃ H ₈ NO
73	3	M - C ₆ H ₁₂ , a ₄	C ₃ H ₇ NO
69	58	M - (NH ₂ OH + C ₄ H ₇ [•]), a ₅	C ₅ H ₉
		M - (C ₃ H ₆ NOH + [•] CH ₃), a ₆	
58	3	M - ([•] CH ₂ OH + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₄), c ₃	C ₃ H ₈ N
57	5	M - (CH ₃ OH + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₄), c ₃	C ₅ H ₇ N
56	41	M - (C ₃ H ₆ NOH + C ₂ H ₄), a ₆	C ₄ H ₈
55	45		C ₄ H ₇
42	22	M - (C ₃ H ₆ NOH + C ₃ H ₆), a ₆	C ₃ H ₆
41	47	M - (C ₃ H ₆ NOH + C ₃ H ₇), a ₆	C ₃ H ₅

¹ m/z 142= 100%**Tabelle 6:** Massenspektrum von **1C** (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
141	1	M	C ₉ H ₁₉ N
127	7	M - [•] CH ₃ + 1, Isotopenpeak	
126	82	M - [•] CH ₃ , a ₃	C ₉ H ₁₆ N
110	3	M - ([•] NH ₂ + [•] CH ₃)	C ₈ H ₁₄
109	18	M - ([•] CH ₃ + NH ₃), a ₄	C ₈ H ₁₃
99	3	M - ([•] C ₃ H ₅ + H [•]), a ₂	C ₆ H ₁₃ N
		M - C ₃ H ₆ , a ₂	
98	8	M - ([•] C ₃ H ₅ + H [•] + H [•]), a ₂	C ₆ H ₁₂ N
		M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₄), b ₅	
96	2		C ₆ H ₁₀ N
84	5	M - C ₃ H ₆ NH, a ₆	C ₆ H ₁₂
82	4		C ₅ H ₈ N
81	3		C ₆ H ₉
71	7	Isotopenpeak von m/z 70	-

70	88	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_4\text{H}_8$), a_3	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}$
69	41	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NH} + \cdot\text{CH}_3$), a_6	C_5H_9
58	100	M - C_6H_{11} , a_2	$\text{C}_3\text{H}_8\text{N}$
56	17	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NH} + \text{C}_2\text{H}_4$), a_6	C_4H_8
42	76	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NH} + \text{C}_3\text{H}_6$), a_6	C_3H_6
41	82	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_4 + \text{C}_3\text{H}_6\text{NH}$), b_5	C_3H_5

¹ m/z 58 = 100%**Tabelle 7:** Massenspektrum von **2** (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
173	3	M + H ⁺ , a_1	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_2$
172	11	M	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_2$
158	15	(M+1) - $\cdot\text{CH}_3$, a_1	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_2$
157	2	M - $\cdot\text{CH}_3$, a_3 , b_1	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$
154	2	M - H_2O , b_2	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}$
142	78	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3$), b_1 M - CH_2O , c_1	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_2$ $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}$
141	2	M - $\cdot\text{OCH}_3$, c_1	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}$
140	9	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{OH}$), b_3	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}$
139	1	M - ($\text{H}_2\text{O} + \cdot\text{CH}_3$), b_2	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}$
127	2	M - ($\text{NO}^\bullet + \cdot\text{CH}_3$), d_1	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}$
125	1	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{NHOH}$), a_4	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}$
124	2	M - ($\text{H}_2\text{O} + \cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3$), b_2 M - ($\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{O}$), c_2 M - ($\text{H}_2\text{O} + \text{NO}^\bullet$), d_2	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}$ $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}$ C_9H_{16}
123	2	M - ($\text{H}_2\text{O} + \cdot\text{OCH}_3$), c_2	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}$
122	2	M - ($\text{H}_2\text{O} + \cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{OH}$), b_4	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}$
116	11	M - C_4H_8 , e_1	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2$
109	8	M - ($\text{H}_2\text{O} + \text{NO}^\bullet + \cdot\text{CH}_3$), d_2	C_8H_{13}
108	4	M - ($\text{H}_2\text{O} + \cdot\text{OCH}_3 + \cdot\text{CH}_3$), c_2	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}$
107	4		C_8H_{11}
102	15	(M+1) - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_4\text{H}_8$), a_3 , f_1	$\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}_2$
101	2	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_4\text{H}_8$), a_3 , e_1	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$
100	2	M - $\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}^\bullet$, a_6 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), b_1 M - ($\text{NO}^\bullet + \text{C}_3\text{H}_6$), d_1	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$
99	3	M - ($\text{NO}^\bullet + \text{C}_3\text{H}_7$), d_1	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}$
98	8	M - ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_2\text{H}_3\text{OH}$), c_1 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{OH}$), b_1	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}$ $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}$
97	1	M - ($\cdot\text{OCH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{OH}$), c_1	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}$
96	1	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{OH} + \text{C}_2\text{H}_3\text{OH}$), b_3	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}$
86	15	M - ($\text{NO}^\bullet + \text{C}_4\text{H}_8$), d_1 M - ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_4\text{H}_8$), e_1	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$ $\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}$
85	28	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}^\bullet + \cdot\text{CH}_3$), a_6 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), b_1	$\text{C}_5\text{H}_9\text{O}$
82	4	M - ($\text{H}_2\text{O} + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), b_2 M - ($\cdot\text{OCH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{OH} + \cdot\text{CH}_3$), c_1	C_6H_{10}
74	8	(M+1) - $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OH}^\bullet$, a_2	$\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}$
73	5	M - $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OH}^\bullet$, a_2	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$
72	8	M - ($\text{C}_2\text{H}_3\text{OH} + \text{C}_4\text{H}_8$), e_1	$\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}$
71	100	M - ($\text{NO}^\bullet + \text{C}_4\text{H}_8 + \cdot\text{CH}_3$), d_1	$\text{C}_4\text{H}_7\text{O}$
69	8		C_5H_9

68	20		C ₅ H ₈
67	10		C ₅ H ₇
58	14	M - (CH ₂ O + C ₂ H ₃ OH + C ₃ H ₄), c ₁	C ₃ H ₈ N
57	70	M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₃ OH + C ₃ H ₄), c ₁ M - ([•] CH ₃ + C ₆ H ₁₁ OH), b ₁ M - (H ₂ O + [•] CH ₃ + C ₆ H ₁₀), b ₂ M - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈ + C ₆ H ₁₁ OH), e ₁	C ₃ H ₇ N C ₂ H ₃ NO C ₂ H ₃ NO
56	24	M - (C ₃ H ₆ NO [•] + C ₂ H ₃ OH), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₂ H ₃ OH), b ₁ M - (NO [•] + C ₅ H ₉ OH), d ₁	C ₄ H ₈
42	19	M - (C ₃ H ₆ NO [•] + C ₃ H ₅ OH), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₅ OH), b ₁ M - (NO [•] + C ₆ H ₁₁ OH), d ₁ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₃ OH + C ₃ H ₄ + [•] CH ₃), c ₁	C ₃ H ₆ C ₂ H ₄ N
41	75	M - (C ₃ H ₆ NO [•] + C ₃ H ₆ OH), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₆ OH), b ₁ M - (CH ₂ O + C ₂ H ₃ OH + C ₃ H ₆ NH), c ₁ M - (NO [•] + C ₆ H ₁₂ OH), d ₁	C ₃ H ₅

¹ m/z 71 = 100%

Tabelle 8: Massenspektrum von **3** (4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
171	<1	M + H [•] , a ₁	C ₉ H ₁₇ NO ₂
170	4	M	C ₉ H ₁₆ NO ₂
156	1	(M+1) - [•] CH ₃ , a ₁	C ₈ H ₁₄ NO ₂
155	1	M - [•] CH ₃ , a ₃ , b ₁	C ₈ H ₁₃ NO ₂
140	2	M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₁ M - CH ₂ O, c ₁ M - [•] NO, d ₁	C ₇ H ₁₀ NO ₂ C ₈ H ₁₄ NO C ₉ H ₁₆ O
139	<1	M - [•] OCH ₃ , c ₁	C ₈ H ₁₃ NO
138	<1	M - ([•] CH ₃ + [•] OH), b ₃	C ₈ H ₁₂ NO
125	6	M - ([•] NO + [•] CH ₃), d ₁	C ₈ H ₁₃ O
124	<1	M - ([•] OCH ₃ + [•] CH ₃), c ₁	C ₇ H ₁₀ NO
123	<1	M - ([•] CH ₃ + NHOH [•]), a ₄	C ₈ H ₁₁ O
115	1	(M+1) - C ₄ H ₈ , e ₂	C ₅ H ₉ NO ₂
114	15	M - C ₄ H ₈ , e ₂ , f ₁	C ₅ H ₈ NO ₂
100	2	(M+1) - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈) a ₃ , e ₂	C ₄ H ₆ NO ₂
99	1	M - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈) a ₃ , e ₂	C ₄ H ₅ NO ₂
98	2	M - C ₃ H ₆ NO, a ₆ M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃ + C ₂ H ₂ O) b ₁ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO) b ₁ M - (CH ₂ O + CH ₂ CO), c ₁ M - ([•] NO + C ₃ H ₆), d ₁	C ₆ H ₁₀ O C ₅ H ₁₈ NO C ₆ H ₁₀ O C ₆ H ₁₂ N C ₆ H ₁₀ O
97	1	M - ([•] OCH ₃ + CH ₂ CO), c ₁	C ₆ H ₁₁ N
96	<1	M - ([•] CH ₃ + [•] OH + C ₂ H ₂ O) b ₃	C ₆ H ₁₀ N
87	1	(M+1) - (C ₄ H ₈ + CO) f ₁	C ₄ H ₉ NO
86	10	M - (C ₄ H ₈ + CO) f ₁	C ₄ H ₈ NO
84	2	M - ([•] NO + C ₄ H ₈) d ₁ M - (CH ₂ O + C ₄ H ₈) e ₂	C ₅ H ₈ O C ₄ H ₆ NO
83	8	M - (C ₃ H ₆ NO + [•] CH ₃) a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + [•] CH ₃) b ₁	C ₅ H ₇ O

		M - C ₄ H ₉ NO, f ₁	
82	1	M - ([•] OCH ₃ + CH ₂ CO + [•] CH ₃), c ₁	C ₅ H ₈ N
72	1	M - (C ₄ H ₈ + C ₂ H ₂ O) e ₂	C ₃ H ₆ NO
71	2		C ₄ H ₅ NO
70	1		C ₄ H ₈ N
69	2		C ₅ H ₉
58	2	M - (CH ₂ O + C ₂ H ₂ O + C ₃ H ₄) c ₁	C ₃ H ₈ N
57	13	M - ([•] CH ₃ + C ₆ H ₁₀ O) b ₁ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₂ O + C ₃ H ₄) c ₁ M - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈ + C ₂ H ₂ O) e ₂	C ₂ H ₃ NO C ₃ H ₇ N C ₂ H ₃ NO
56	100	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₂ H ₂ O) a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₂ H ₂ O) b ₁	C ₄ H ₈
42	82	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₃ H ₄ O) a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₄ O) b ₁ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₂ O + C ₃ H ₄ + [•] CH ₃) c ₁	C ₂ H ₄ N
41	34	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₃ H ₅ O) a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₅ O) b ₁ M - (CH ₂ O + C ₂ H ₂ O + C ₃ H ₆ NH) c ₁	C ₃ H ₅

¹ m/z 56= 100%**Tabelle 9:** Massenspektrum von **4** (4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
183	1	² R-N=CH ₂	
172	<1	M + H [•] , a ₁	C ₉ H ₂₀ N ₂ O
171	3	M	C ₉ H ₁₉ N ₂ O
157	1	(M+1) - [•] CH ₃ , a ₁	C ₈ H ₁₇ N ₂ O
155	1	(M+1) - NH ₃ , b ₂ M - [•] NH ₂ , f ₂	C ₉ H ₁₆ NO
153	1	M - H ₂ O	C ₉ H ₁₇ N ₂
141	3	M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₁ M - (CH ₂ O) c ₁	C ₇ H ₁₃ N ₂ O C ₈ H ₁₇ N ₂
140	1	(M+1) - (NH ₃ + [•] CH ₃), b ₂ M - [•] OCH ₃ , c ₁ M - ([•] NH ₂ + [•] CH ₃), f ₂	C ₈ H ₁₄ NO C ₈ H ₁₆ N ₂ C ₈ H ₁₄ NO
138	2	M - NH ₂ OH, a ₅	C ₉ H ₁₆ N
124	2	M - (NH ₃ + CH ₂ O), c ₂ M - ([•] CH ₃ + [•] NHOH), a ₄ M - (NH ₃ + [•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₂ M - (NH ₃ + [•] NO), d ₂	C ₈ H ₁₄ N C ₇ H ₁₀ NO C ₉ H ₁₆
116	<1	(M+1) - C ₄ H ₈ , e ₃	C ₅ H ₁₂ N ₂ O
115	5	M - C ₄ H ₈ , e ₃	C ₅ H ₁₁ N ₂ O
114	<1	M - (C ₃ H ₄ NH ₂ [•] + H [•]), a ₂ M - C ₃ H ₅ NH ₂ , a ₂	C ₆ H ₁₂ NO
109	1	M - (NH ₃ + NO [•] + [•] CH ₃), d ₂	C ₈ H ₁₃
108	1	M - (NH ₃ + [•] OCH ₃ + [•] CH ₃), c ₂	C ₇ H ₁₀ N
101	2	M - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈), a ₅ , e ₃	C ₄ H ₉ N ₂ O
99	1	M - C ₃ H ₆ NO, a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₁	C ₆ H ₁₃ N
98	6	M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NH ₂), b ₁ M - (CH ₂ O + C ₂ H ₃ NH ₂), c ₁	C ₈ H ₁₅ NO C ₆ H ₁₂ N
97	2	M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₃ NH ₂), c ₁	C ₆ H ₁₁ N

85	21	M - (CH ₂ O + C ₄ H ₈) e ₃	C ₄ H ₉ N ₂
84	20	M - (C ₃ H ₆ NO + [•] CH ₃), a ₆ M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₁	C ₅ H ₁₀ N
83	1	M - ([•] NH ₂ + [•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), f ₂	C ₆ H ₁₁
82	9	M - (NH ₃ + [•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₂ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₃ NH ₂ + [•] CH ₃), c ₁	C ₆ H ₁₀ C ₅ H ₈ N
74	1	(M+1) - C ₆ H ₁₀ NH ₂ [•] , a ₂	C ₃ H ₈ NO
73	1	M - C ₆ H ₁₀ NH ₂ [•] , a ₂	C ₃ H ₇ NO
72	4	M - (C ₄ H ₈ + C ₂ H ₃ NH ₂), e ₃	C ₃ H ₆ NO
70	100		C ₅ H ₁₀
58	10	M - (CH ₂ O + C ₂ H ₃ NH ₂ + C ₃ H ₄), c ₁ (M+1) - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈ + C ₂ H ₂ O), e ₃	C ₃ H ₈ N C ₂ H ₄ NO
57	7	M - ([•] CH ₃ + C ₆ H ₁₁ NH ₂), b ₁ M - (NH ₃ + [•] CH ₃ + C ₆ H ₁₀), b ₂ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₃ NH ₂ + C ₃ H ₄), c ₁	C ₂ H ₃ NO C ₃ H ₇ N
56	24	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₂ H ₃ NH ₂), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₂ H ₃ NH ₂), b ₁	C ₄ H ₈
43	28		-
42	30	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₃ H ₅ NH ₂), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₅ NH ₂), b ₁ M - ([•] OCH ₃ + C ₂ H ₃ NH ₂ + C ₃ H ₄ + [•] CH ₃), c ₁	C ₃ H ₆ C ₂ H ₄ N
41	49	M - (C ₃ H ₆ NO + C ₃ H ₆ NH ₂), a ₆ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₃ H ₆ NH ₂), b ₁ M - (CH ₃ O + C ₂ H ₃ NH ₂ + C ₃ H ₆ NH), c ₁	C ₃ H ₅

¹ m/z 70 = 100%² Artefakt nach Reaktion der Aminogruppe von **4** mit HCHO (aus MeOH; ΔT) zu R-N=CH₂.**Tabelle 10:** Massenspektrum von **5** (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl - benzoat).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
277	4	M + H [•] , a ₁	C ₁₆ H ₂₃ NO ₃
276	2	M	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃
262	7	(M+1) - [•] CH ₃ , a ₁	C ₁₅ H ₂₀ NO ₃
246	2	M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₁ M - (CH ₂ O), c ₁	C ₁₄ H ₁₆ NO ₃ C ₁₅ H ₂₀ NO ₂
190	1	M - (CH ₂ O + C ₄ H ₈), e ₁	C ₁₁ H ₁₂ NO ₂
155	8	(M+1) - C ₆ H ₅ COOH, b ₂ , f ₃	C ₆ H ₁₇ NO
154	9	M - C ₆ H ₅ COOH, b ₂ , f ₃	C ₆ H ₁₆ NO
141	9	Isotopenpeak von m/z 140	-
140	84	(M+1) - ([•] CH ₃ + C ₆ H ₅ COOH), b ₂	C ₈ H ₁₄ NO
139	4	M - ([•] CH ₃ + C ₆ H ₅ COOH), b ₂	C ₈ H ₁₃ NO
124	38	M - (C ₆ H ₅ COOH + [•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₂ M - (C ₆ H ₅ COOH + CH ₂ O), c ₂ M - (C ₆ H ₅ COOH + NO [•]), d ₂	C ₇ H ₁₀ NO C ₈ H ₁₄ N C ₉ H ₁₆
123	4	M - (C ₆ H ₅ COOH + [•] OCH ₃), c ₂	C ₈ H ₁₃ N
122	5	M - (C ₆ H ₅ COOH + [•] CH ₃ + [•] OH), b ₄ M - C ₉ H ₁₆ NO, b ₂ , f ₃	C ₈ H ₁₂ N C ₇ H ₆ O ₂
109	37	M - (C ₆ H ₅ COOH + NO [•] + [•] CH ₃), d ₂	C ₈ H ₁₃
108	11	M - (C ₆ H ₅ COOH + [•] OCH ₃ + [•] CH ₃), c ₂	C ₇ H ₁₀ N
107	6		C ₈ H ₁₁ C ₇ H ₉ N
105	100	M - (C ₉ H ₁₆ NO + [•] OH), f ₃	C ₇ H ₅ O
100	5		-

98	15	M- ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{OCOC}_6\text{H}_5$), b_1 M- ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_2\text{H}_3\text{OCOC}_6\text{H}_5$), c_1	$\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}$
82	16	M- ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH} + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), b_2	C_6H_{10}
77	87	M- ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO} + \cdot\text{OH} + \text{CO}$), f_3	C_6H_5
69	14		C_5H_9
68	9		C_5H_8
67	20		C_5H_7
58	9	M- ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_2\text{H}_3\text{OCOC}_6\text{H}_5 + \text{C}_3\text{H}_4$), c_1	$\text{C}_3\text{H}_8\text{N}$
57	10	M- ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH} + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_6\text{H}_{10}$), b_2	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$
56	4		C_4H_8
55	29		-
53	3		-
51	34		-
42	28		-
41	75		C_3H_5

¹ m/z 105= 100%**Tabelle 11:** Massenspektrum von **6** (4-Carboxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
201	2	M + H ⁺ , a_1	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_3$
200	10	M	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_3$
186	8	(M+1) - $\cdot\text{CH}_3$, a_1	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_3$
185	5	M - $\cdot\text{CH}_3$, b_1	$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_3$
170	3	M - M - CH_2O , c_1	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}_3$ $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_2$
169	1	M - $\cdot\text{OCH}_3$, c_1	$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_2$
168	2	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{OH}$), b_3	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2$
154	1	M - HCOOH , b_2	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}$
153	1	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{NHOH}$), a_4	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{COOH}$
151	1		-
141	3	(M+1) - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{COOH}^\bullet$), f_2	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}$
140	17	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{COOH}^\bullet$), f_2	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}$
128	1	M - $\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}$, a_6	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_2$
124	3	M - ($\text{HCOOH} + \cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3$), b_2 M - ($\text{HCOOH} + \text{CH}_2\text{O}$), c_2 M - ($\text{HCOOH} + \text{NO}^\bullet$), d_2	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}$ $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}$ C_9H_{16}
123	6	M - ($\text{HCOOH} + \cdot\text{OCH}_3$), c_2	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}$
122	2	M - ($\text{HCOOH} + \cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{OH}$), b_4	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}$
121	1		-
115	7	Isotopenpeak von m/z 114	-
114	87	M - $\text{C}_3\text{H}_5\text{COOH}$, a_2 M - ($\text{C}_3\text{H}_4\text{COOH}^\bullet + \text{H}^\bullet$), a_2 M - ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_4\text{H}_8$), e_4	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}$ $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_2$
113	10	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NO} + \cdot\text{CH}_3$), a_6 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), b_1 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$), b_5	$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}$
109	6	M - ($\text{HCOOH} + \cdot\text{NO} + \cdot\text{CH}_3$), d_2	C_8H_{13}
108	3	M - ($\text{HCOOH} + \cdot\text{OCH}_3 + \cdot\text{CH}_3$), c_2	-
107	3		C_8H_{11} $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}$
98	7	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH} + \cdot\text{CH}_3$), b_5 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$), b_1 M - ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$), c_1	$\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}$

97	5	M - ($\cdot\text{OCH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$), c_1	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}$
95	7		-
83	7	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{COOH}^\bullet + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), f_2	C_6H_{11}
82	5	M - ($\cdot\text{OCH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH} + \cdot\text{CH}_3$), c_1 M - ($\text{HCOOH} + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), b_2	$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}$ C_6H_{10}
81	14		C_6H_9
74	9	(M+1) - $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{COOH}^\bullet$, a_2	$\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}$
73	10	M - $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{COOH}^\bullet$, a_2	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$
69	39		C_5H_9
58	51	M - ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH} + \text{C}_3\text{H}_4$), c_1	$\text{C}_3\text{H}_8\text{N}$
57	12	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_6\text{H}_{11}\text{COOH}$), b_1 M - ($\text{HCOOH} + \cdot\text{CH}_3 + \text{C}_6\text{H}_{10}$), b_2 M - ($\cdot\text{OCH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH} + \text{C}_3\text{H}_4$), c_1	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$ $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$
56	65	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NO} + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$), a_6 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO} + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$), b_1	C_4H_8
55	40		-
43	39		-
42	28	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NO} + \text{C}_3\text{H}_5\text{COOH}$), a_6 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO} + \text{C}_3\text{H}_5\text{COOH}$), b_1 M - ($\cdot\text{OCH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH} + \text{C}_3\text{H}_4 + \cdot\text{CH}_3$), c_1	C_3H_6 $\text{C}_2\text{H}_4\text{N}$
41	100	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NO} + \text{C}_3\text{H}_6\text{COOH}$), a_6 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO} + \text{C}_3\text{H}_6\text{COOH}$), b_1 M - ($\text{CH}_2\text{O} + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH} + \text{C}_3\text{H}_6\text{NH}$), c_1	C_3H_5

¹ m/z 41 = 100%

Tabelle 12: Massenspektrum von **9** (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
187	1	M + H ⁺	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_3$
186	10	M	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_3$
172	2	(M+1) - $\cdot\text{CH}_3$	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_3$
171	7	M - $\cdot\text{CH}_3$, b_1	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_3$
156	4	M - NO ⁺ , a_1 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{CH}_3$), b_1 M - CH_2O , d	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_2$ $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3$ $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_2$
140	1	M - HCOOH, e_1	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}$
127	<1		-
126	16	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{COOH}$), b_1	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}$
114	2	M - $\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}$, c_1 M - (NO ⁺ + C_3H_6), a_1 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$), b_1	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$
113	<1	M - (NO ⁺ + $\text{C}_3\text{H}_7^\bullet$), a_1	$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2$
111	2	M - (NO ⁺ + COOH ⁺), a_1	C_8H_{15}
110	2	M - (HCOOH + NO ⁺), e_1	C_8H_{14}
109	3		-
102	<1	Isotopenpeak von m/z 101	
101	4	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_3\text{H}_4\text{NO}^+$), e_1 M - (NO ⁺ + C_4H_7^+), a_1	$\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2$
100	88	M - (NO ⁺ + C_4H_8), a_1	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$
99	5	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$), b_1 M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_3\text{NO} + \cdot\text{CH}_3$), b_1	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$ $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$
98	1	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}$), b_1	$\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}$
96	1		-
95	5	M - (HCOOH + NO ⁺ + $\cdot\text{CH}_3$), e_1	C_7H_{11}

85	5	M - (NO [•] + C ₄ H ₈ + [•] CH ₃), a ₁	C ₄ H ₅ O ₂
84	2	M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ COOH + [•] CH ₃), b ₁	C ₄ H ₆ NO
83	18		-
82	5		-
81	2		-
74	27		-
70	2	M - C ₄ H ₇ C(CH) ₂ ⁺ , e ₁	C ₃ H ₄ NO
69	20	M - (C ₃ H ₆ NO + [•] COOH), c ₁ M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + [•] COOH), a ₁ M - ([•] CH ₃ + [•] COOH + C ₂ H ₃ NO), b ₁	C ₅ H ₉
68	2	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + [•] COOH), b ₁	C ₅ H ₈
67	11		-
59	19		-
57	11	M - ([•] CH ₃ + C ₅ H ₉ COOH), b ₁	C ₂ H ₃ NO
56	100	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ CHCOOH), a ₁	C ₄ H ₈
55	33	M - (NO [•] + C ₄ H ₇ C(CH) ₂ ⁺), e ₁	C ₄ H ₇
42	20	M - (NO [•] + C ₅ H ₉ COOH), a ₁ M - (C ₃ H ₆ NO + C ₂ H ₃ COOH), c ₁ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + C ₂ H ₃ COOH), b ₁ M - (CH ₂ O + C ₅ H ₉ COOH), d	C ₃ H ₆ C ₂ H ₄ N
41	90	M - (NO [•] + C ₄ H ₈ + CH ₂ COOH [•]), a ₁ M - (NO [•] + C ₃ H ₆ CHCOOH + [•] CH ₃), a ₁ M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CHCOOH [•] + C ₂ H ₃ NO), b ₁	C ₃ H ₅

m/z 56= 100%

Tabelle 13: Massenspektrum von **11** (4-Amino-2,2,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl).

M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
157	<1	M + H [•]	C ₇ H ₁₅ N ₃ O
156	4	M	C ₇ H ₁₄ N ₃ O
142	1	(M+1) - [•] CH ₃	C ₆ H ₁₂ N ₃ O
141	<1	M - [•] CH ₃ , b ₂	C ₆ H ₁₁ N ₃ O
127	5	Isotopenpeak von m/z 126	-
126	49	M - NO [•] , a ₂ M - CH ₂ O, d	C ₇ H ₁₄ N ₂ C ₆ H ₁₂ N ₃
125	17	M - (NO + H [•])	C ₇ H ₁₃ N ₂
112	2	Isotopenpeak von m/z 111	-
111	39	M - (NO [•] + [•] CH ₃), a ₂	C ₆ H ₁₁ N ₂
109	3		-
98	4	M - ([•] CH ₃ + NH ₂ CHN [•]), b ₂	C ₅ H ₈ NO
97	2		-
94	4		-
85	6		-
84	12	M - (NO [•] + C ₃ H ₆), a ₂ M - C ₃ H ₆ NO, c ₂ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₂	C ₄ H ₈ N ₂
83	11	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + H [•]), a ₂ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + H [•]), b ₂	C ₄ H ₇ N ₂
71	2		-
70	31	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ N [•]), a ₂	C ₄ H ₈ N
69	12	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + H [•]), a ₂ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + [•] CH ₃), b ₂	C ₃ H ₅ N ₂
68	18	M - (C ₃ H ₆ NO + [•] NH ₂), c ₂	C ₄ H ₆ N

67	5	M - (C ₃ H ₆ NO + NH ₃)	C ₄ H ₅ N
59	5	Isotopenpeak von m/z 58	
58	95	C ₃ H ₆ NH ₂ ⁺	C ₃ H ₈ N
57	10	M - ([•] CH ₃ + NH ₂ CNC ₃ H ₆), b ₂	C ₂ H ₃ NO
43	100	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + C ₃ H ₅), a ₂	CH ₃ N ₂
42	73	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + NH ₂ CN), a ₂ M - (C ₃ H ₆ NO + NH ₂ CN), c ₂ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + NH ₂ CN), b ₂ M - (CH ₂ O + NH ₂ CNC ₃ H ₆), d	C ₃ H ₆ C ₂ H ₄ N
41	65	M - ([•] CH ₃ + NH ₂ CHN [•] + C ₂ H ₃ NO),	C ₃ H ₅

¹ m/z 43= 100%**Tabelle 14:** Massenspektrum von **12** (2,2,4,5,5-Pentamethylimidazolin-1-oxyl).

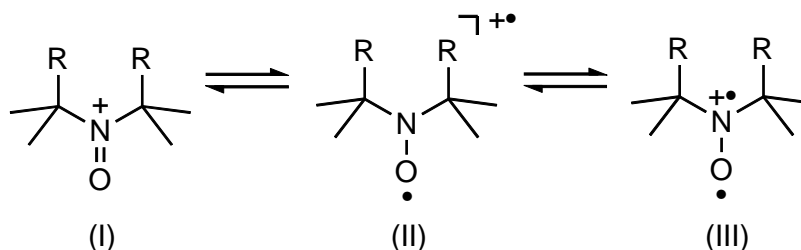
M/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
156	1	M + H [•]	C ₈ H ₁₆ N ₂ O
155	6	M	C ₈ H ₁₅ N ₂ O
140	2	M - [•] CH ₃ , b ₄	C ₇ H ₁₂ N ₂ O
126	5		-
125	52	M - NO [•] , a ₄ M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₄ M - CH ₂ O, d	C ₈ H ₁₅ N C ₆ H ₉ N ₂ O
124	5	M - (NO [•] + H [•]), a ₄	C ₈ H ₁₄ N
111	6		-
110	79	M - (NO [•] + [•] CH ₃), a ₄	C ₇ H ₁₂ N
108	1		-
99	5	M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CN), b ₄	C ₅ H ₉ NO
98	1	M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CHN [•]), b ₄	C ₅ H ₈ NO
96	1		-
95	5		-
94	1		-
93	2		-
84	4	M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CN + [•] CH ₃), b ₄	C ₄ H ₆ NO
83	21	M - (NO [•] + C ₃ H ₆), a ₄ M - C ₃ H ₆ NO, c ₄ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₄	C ₅ H ₉ N
82	1	M - (NO [•] + C ₃ H ₇ [•]), a ₄ M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + H [•]), a ₄	C ₅ H ₈ N
78	3		-
70	6		-
69	90	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ N [•]), a ₄	C ₅ H ₉
68	6	M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₄ M - (C ₃ H ₆ NO + [•] CH ₃), c ₄	C ₄ H ₆ N
67	7		-
63	5		-
58	5		-
57	2	M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CNC ₃ H ₆), b ₄	C ₂ H ₃ NO
56	2		-
55	7		-
53	9		-
43	7		-
42	86	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + CH ₃ CN), a ₄ M - (C ₃ H ₆ NO + CH ₃ CN), c ₄ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + CH ₃ CN), b ₄	C ₃ H ₆

		M - (CH ₂ O + CH ₃ CNC ₃ H ₆), d	C ₂ H ₄ N
41	100	M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CHN [•] + C ₂ H ₃ NO), b ₄	C ₃ H ₅

¹ m/z 41= 100%**Tabelle 15:** Massenspektrum von **13** (2,2,3,4,5,5-Hexamethylimidazolidin-1-oxyl).

m/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
172	<1	M + H [•]	C ₉ H ₂₀ N ₂ O
171	4	M	C ₉ H ₁₉ N ₂ O
157	<1	(M+1) - [•] CH ₃	C ₈ H ₁₇ N ₂ O
156	1	M - [•] CH ₃ , b ₃	C ₈ H ₁₆ N ₂ O
141	19	M - NO [•] , a ₃ M - ([•] CH ₃ + [•] CH ₃), b ₃ M - CH ₂ O, d	C ₉ H ₁₉ N C ₇ H ₁₃ N ₂ O C ₈ H ₁₇ N ₂
139	<1		-
126	<1	M - (NO [•] + [•] CH ₃), a ₃	C ₈ H ₁₆ N
125	<1		-
124	3		-
122	1		-
109	<1		-
99	2	M - (NO [•] + C ₃ H ₆), a ₃ M - (C ₃ H ₆ NO), c ₃ M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CHNCH ₃), b ₃ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO), b ₃	C ₆ H ₁₃ N C ₅ H ₉ NO C ₆ H ₁₃ N
98	10	M - (NO [•] + C ₃ H ₇ [•]), a ₃ M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CH ₂ NCH ₃ [•]), b ₃	C ₆ H ₁₂ N C ₅ H ₈ NO
97	<1		-
96	1		-
84	4	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ + [•] CH ₃), a ₃ M - (C ₃ H ₆ NO + [•] CH ₃), c ₃ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + [•] CH ₃), b ₃ M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CHNCH ₃ + [•] CH ₃), b ₃	C ₅ H ₁₀ N C ₄ H ₆ NO
82	4		-
73	4	Isotopenpeak von m/z 72	
72	68	M - C ₆ H ₁₃ N, e ₂	C ₃ H ₆ NO
71	23	M - (NO [•] + C ₅ H ₁₀), a ₃	C ₄ H ₉ N
70	9	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ NCH ₃), a ₃	C ₅ H ₁₀
69	2		-
58	7		-
57	4	M - ([•] CH ₃ + C ₆ H ₁₃ N), b ₃	C ₂ H ₃ NO
56	100	M - (NO [•] + C ₅ H ₁₀ + [•] CH ₃), a ₃	C ₃ H ₆ N
55	14	M - (NO [•] + C ₃ H ₆ NCH ₃ + [•] CH ₃), a ₃	C ₄ H ₇
42	32	M - (C ₃ H ₆ NO + CH ₃ CHNCH ₃), c ₃ M - ([•] CH ₃ + C ₂ H ₃ NO + CH ₃ CHNCH ₃), b ₃ M - (CH ₂ O + CH ₃ CHNCH ₃ C ₃ H ₆), d	C ₃ H ₆ C ₂ H ₄ N
41	25	M - ([•] CH ₃ + CH ₃ CH ₂ NCH ₃ [•] + C ₂ H ₃ NO), b ₃	C ₃ H ₅

¹ m/z 56= 100%



Die vorgeschlagenen Mechanismen zur Bildung der nachgewiesenen Fragment-Ionen stehen dabei mit den Strukturen **I** und **III** in Einklang.

Fast alle untersuchten Nitroxide, jedoch nicht das Hydroxylamin **1B** und das sekundäre Amin **1C** zeigen trotz sicherer chromatographischer Abtrennung der u. U. vorhandenen Hydroxylamine neben dem Molpeak (M) ein **(M + 1)-Signal**, daß höher ist, als der zu erwartende Isotopenpeak von M, so daß von der Aufnahme eines H-Atoms durch das Molekülion unter den Bedingungen der MS ausgegangen werden kann. Nach Morrison und Davies [40], die zu diesem Phänomen Experimente mit D₂O durchführten, kommt es durch Wasserstoffabstraktion aus Wasserresten in der Ionenquelle des Massenspektrometers zu einer partiellen Reduktion der Nitroxide. Neben den (M + 1)-Signalen finden sich dementsprechend auch (M + 1 - 15)-Peaks, welche aus dem Verlust eines Methylradikals aus dem (M + 1)-Ion durch α -Spaltung (siehe Schema 1, a₁) resultieren. Diese Signale sind z. T. intensiver als die (M - 15)-Signale, da diese α -Spaltung bei den Nitroxiden per se einen geringeren Stellenwert als bei den Aminen und Hydroxylaminen besitzt. In den Massenspektren der Amine bzw. Hydroxylamine gehören die entsprechenden (M - •CH₃)-Fragmente zu den intensivsten Signalen (vgl. MS von **1**, **1B**, und **1C**, Tabellen 4- 6).

Ein für Amine mit unsubstituierten α -Positionen häufig typisches **(M - 1)-Signal** kann mit schwacher Intensität nur im Spektrum von **1B** festgestellt werden und dürfte hier allerdings eine partielle Reoxidation des Hydroxylamins zum Nitroxid **1** repräsentieren.

Die Grundgerüst-Fragmentierung von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinen kann wie beim unsubstituierten Piperidin mit einer Ringöffnung durch α -Spaltung der 2- 3-Bindung eingeleitet werden. Diese dürfte hier jedoch quantitativ weniger bedeutsam sein, da energetisch günstigere Möglichkeiten der Ringöffnung zur Verfügung stehen (s. u.). Einige Grundgerüstfragmente, vor allem in den Spektren von **1**, **1C**, **2**, **4** und **6**, lassen sich allerdings aus dem durch Ringöffnung des Molekül-Ions resultierenden distonischen Radikalkation unter Berücksichtigung der typischen Wasserstoffwanderungen herleiten. Diese Bildungswege sind in Schema 1 unter a₂ zusammengefaßt.

Weitere Möglichkeiten der Grundgerüst-Fragmentierung ergeben sich nach Ausbildung einer Doppelbindung im Ringsystem durch **Retro-Diels-Alder-Reaktionen** (RDA). Doppelbindungen im gesättigten Ring können dabei durch Eliminierung eines Methylradikals am α -C-Atom (b_1 , b_5) und Reaktionen unter Einbeziehung der N-OH bzw. N-O•-Funktion entstehen. Hierin eingeschlossen sind H-Wanderungen zur Radikalposition am Heteroatom mit anschließendem Verlust einer Methylgruppe (a_3) sowie vor allem die für Nitroxide charakteristische Abspaltung von CH_2O und $\bullet\text{OCH}_3$ (c_1). Beim Hydroxylamin kann eine analoge Abspaltung von $\text{CH}_2\text{OH}\bullet$ und CH_3OH aus dem Molekülion festgestellt werden (c_3). Ein energetisch günstiger Weg der Ringöffnung ist offensichtlich die ebenfalls für Nitroxide typische Eliminierung von $\text{NO}\bullet$ (d_1).

In Abhängigkeit von der Natur des Substituenten in Position 4 des Piperidinrings ergeben sich weitere charakteristische Fragmentierungen, wie z. B., die **Abspaltung von Isobuten**, die bei 4-Substituenten mit freiem Elektronenpaar von diesem ausgeht und zu intensiven Signalen bei M-56 führt, aber auch in Kombination mit anderen Fragmentierungsreaktionen festzustellen ist (s. u.). Diese ist z. B. bei der 4-Oxoverbindung **3** dominierende Primärfragmentierung, aber auch bei **2**, **4** und **6** nachweisbar (e_1 - e_4).

Eine der Möglichkeiten, eine Isobuten-Abspaltung auch bei Verbindungen ohne 4-Substituenten mit freiem Elektronenpaar einzuleiten, kann in der Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C 2 und C 3 gesehen werden, der sich eine RDA-Reaktion anschließt (Schema 1, Weg a_3). Hierzu kann es durch H-Wanderung vom C 3 zur Radikalposition am N-Atom des Rings und anschließender Eliminierung eines Methylradikals am C 2 kommen. Allerdings dürfte bei den 4-substituierten Verbindungen **2-4**, **6** die Isobutenabspaltung vorrangig vom freien Elektronenpaar des 4-Substituenten ausgehen (Weg e).

Während die Isobutenabspaltung in den Spektren von **2-4** sowohl ausgehend vom Molekülion als auch in Kombination mit der Eliminierung von $\bullet\text{CH}_3$ und CH_2O nachvollzogen werden kann (Schema 1, e_1 - e_4), ist diese bei Verbindung **6** ausschließlich nach Formaldehyd-Abspaltung ($\text{M}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_4\text{H}_8$, e_4) und im MS von **5** überhaupt nicht nachzuweisen.

Ein weiterer Abbauweg, der durch eine H-Wanderung zum Ringheteroatom eingeleitet werden kann, dürfte die **Abspaltung von NH_2Y nach Verlust einer Methylgruppe** sein ($\text{Y} = \text{H}$, O• bzw. OH). Für diese Fragmentierung, die bei allen untersuchten Tetramethylpiperidin-Derivaten nachvollziehbar ist, außer beim Benzoessäureester von TEMPOL (**5**), wird der in

Schema 1 unter a₄ formulierte Mechanismus vorgeschlagen, der eine zweite H-Wanderung zur Ladungsstelle am Ringstickstoffatom nach Verlust der Methylgruppe einschließt.

Außerdem können in den Spektren der Verbindungen **1**, **1B** und **4** Signale festgestellt werden, die für die **Eliminierung von NH₂OH aus dem Molekülion** sprechen. Diese wird durch die unter a₅ vorgeschlagene H-Wanderung interpretiert.

Ein ebenfalls bei den Verbindungen **1**, **1B**, **1C**, **2-4**, **6** feststellbarer Abbauweg des Grundgerüsts ist die Abspaltung von **C₃H₆NY aus dem Molekülion**. Diese Reaktion dürfte die Bildung eines distonischen Radikalkations durch α -Spaltung des Ringes einschließen, an die sich die ladungsinduzierte Spaltung der N-C-Bindung anschließt (vgl. Schema 1, a₆). Diese Primärfragmentierung (M-C₃H₆NO, M-72) läßt sich auch in den Massenspektren aller von uns untersuchten Fünfring-Nitroxide feststellen (s.u.).

Durch Eliminierung von C₃H₆NY entsteht ein ebenfalls distonisches Radikalkation (C₆H₁₁R)^{•+}, das eine Reihe von Fragmentationen im unteren Massenbereich liefern dürfte. Da es für letztere zahlreiche Bildungsmöglichkeiten gibt, können diese hier nur exemplarisch diskutiert werden.

Zu den wichtigsten Primärfragmentierungen der Methylpiperidine gehört zweifellos die **Methylradikal-Eliminierung** durch α -Spaltung. Diese liefert beim Hydroylamin **1B** und sekundären Amin **1C** viel intensivere Signale als bei den Nitroxiden. Eine aufeinanderfolgende Abspaltung von zwei Methylgruppen findet sich allerdings nur bei den Nitroxiden (**1**, **2-6**) und nicht bei **1B** und **1C**. Dies spricht für die Beteiligung des primären Radikalzentrums der Nitroxide an diesem Abbauweg, der unter Berücksichtigung wichtiger Sekundärfragmentierungen in Schema 1 unter b₁ zusammengefaßt ist. Eine RDA-Reaktion kann dabei erst nach Verlust von zwei Methylgruppen nachvollzogen werden, während nach Abspaltung eines Methylradikals eine Ringöffnung durch α -Spaltung favorisiert ist. Letztere führt wiederum zu einem distonischen Radikalkation, aus dem C₂H₃NO unter Bildung des bereits erwähnten Radikalkations (C₆H₁₁R)^{•+} und C₂N₃NO + •CH₃ unter Bildung des Kations (C₅H₈R)⁺ eliminiert werden bzw. unter Verlust von C₆H₁₁R als Neutralbruchstück das Radikalkation (C₂H₃NO)^{•+} entsteht.

Der Ringabbau durch eine RDA-Reaktion erfolgt demnach bei den Nitroxiden bevorzugt nach zweifachem Verlust einer Methylgruppe (siehe b₁) bzw. im Fall der Isobutenabspaltung nach Weg a₃ bereits nach Eliminierung einer Methylgruppe aber Einbeziehung einer H-Wanderung (Lokalisierung der Doppelbindung zwischen C 2 und C 3). Ein Verlust von C₂H₄ (bzw. C₂H₃R)

durch RDA-Reaktion im Anschluß an die Abspaltung nur einer Methylgruppe kann dagegen ausschließlich beim sekundären Amin **1C** und Nitroxid **6** (Carboxy-TEMPO) festgestellt werden (vgl. Schema 1, b₅).

Bei den **Verbindungen mit 4-Substituenten 2, 4- 6** lassen sich die zum Weg b₁ analogen Fragmentierungen auch aus der Allylverbindung nachvollziehen, die durch den Verlust des Substituenten unter H-Wanderung (M - HR) resultiert (vgl. b₂). Bei Nitroxid **4** (vermutlich aus Intensitätsgründen) ausschließlich und bei **5** zusätzlich können Fragmentionen dieses Reaktionsweges auch aus dem Ion (M + 1) hergeleitet werden.

Weitere aus dem Ion (M-HR)⁺ resultierende Sekundärfragmentionen dürften durch die zusätzliche Eliminierung von •CH₃ + •OH (vgl. b₄), CH₂O bzw. •OCH₃ (vgl. c₂) sowie NO• (vgl. d₂) entstehen. In den Spektren der Nitroxide **1, 2, 3** und **6** sowie des Hydroxylamins **1B** können (M-32)- bzw. bei **1B** (M-33)-Signale festgestellt werden, die sich durch den **Verlust von •CH₃ + •OH** bzw. •CH₃ + H₂O (bei **1B**) erklären lassen (siehe b₃). Allerdings kann das Signal m/z 124 im Spektrum von **1B** auch auf eine Abspaltung von NH₂OH zurückzuführen sein (vgl. a₅). Aufgrund des Signals für das Produkt der anschließenden RDA-Reaktion im Spektrum von **1B** (m/z 96) könnte allerdings Weg b₃ für die Fragmentierung von **1B** relevant sein. Bei den 4-substituierten Nitroxiden **2, 5** und **6** ist diese Fragmentierung auch ausgehend von den (M-HR)-Ionen belegbar (s.o., Bildung von Ion m/z 122 nach Weg b₄). Das Signal bei m/z 122 im Spektrum von Nitroxid **5** dürfte jedoch vor allem auf das Benzoesäure-Radikalkation zurückzuführen sein (vgl. Schema 1, f₃).

Bei der Interpretation der Massenspektren von Tetramethylpiperidinnitroxiden ist zu beachten, daß die als typisch erkannten **Primärfragmentierungen M-(•CH₃ + •CH₃), M-CH₂O und M-NO•** zu Fragmentionen mit gleicher nominaler Masse (M - 30) aber unterschiedlichen Elementarzusammensetzungen führen, die für verschiedene Piperidinnitroxide, darunter **1** und **3**, durch hochauflösende MS gesichert sind (vgl. [40]). Rückschlüsse darauf ergeben sich nach unseren Befunden auch aus dem Vorhandensein der entsprechenden Sekundärfragmente dieser Abbauege (vgl. b₁, b₂, c₁, c₂ und d₁, d₂), obwohl die Fragmentionen im unteren Massenbereich wegen unterschiedlicher Bildungsmöglichkeiten mit Vorsicht zu interpretieren sind und die RDA-Fragmente nach zweifacher Methylradikal- wie nach Formaldehyd-Abspaltung trotz unterschiedlicher Elementarzusammensetzung ebenfalls die gleiche nominale Masse aufweisen.

Als Indikator für die NO•-Eliminierung in Massenspektren mit Normalauflösung können vor

diesem Hintergrund vor allem die Signale der $M-(NO\bullet + \bullet CH_3)$ angesehen werden (vgl. Schema 1, Weg d). Diese finden sich in den Spektren von 1, 2 und 3. Darüber hinaus können in den Spektren der substituierten Verbindungen 2, 4, 5 und 6 Signale für $M-(HR + NO\bullet + \bullet CH_3)$ festgestellt werden. Aufgrund dieses Befundes und der Intensitätsverhältnisse ist die Schlußfolgerung erlaubt, daß eine Eliminierung von $NO\bullet$ aus dem Molekülion vor allem bei Verbindung 1 sowie der 4-Oxoverbindung 3, im geringeren Umfang auch im Fall von TEMPOL (2) und bei allen anderen Piperidinnitroxiden erst nach Verlust des 4-Substituenten erfolgt.

Die vom freien Elektronenpaar des 4-Substituenten ausgehende ladungsinduzierte **Isobutenabspaltung** ($-C_4H_8$) gemäß Weg e kann für die 4-Hydroxyverbindung 2 (e_1), die 4-Ketoverbindung 3 (e_2) und die 4-Aminoverbindung 4 (e_3) direkt vom Molekülion sowie nach Abspaltung eines Methylradikals oder von Formaldehyd angenommen werden. Daraus resultieren relativ intensive Signale im ansonsten an größeren Peaks armen Bereich oberhalb von m/z 80. Die daraus resultierenden Fragmentationen liefern darüber hinaus eine wichtige Indikation für die Art des 4-Substituenten. Eine entsprechende Isobutenabspaltung nach Abspaltung von Formaldehyd kann auch beim TEMPOL-Benzolat 5 als Weg für die Bildung des Ions m/z 190 diskutiert werden (vgl. e_1). Das Signal bei m/z 114, im Massenspektrum der Carboxyverbindung 6 zweithöchster Peak, läßt sich ebenfalls durch eine Isobutenabspaltung erklären, die aber eine α -H-Wanderung einschließen muß (Weg e_4). Andererseits dürfte dieses Signal teilweise auch auf das nach Weg a_2 durch Ringöffnung und Wasserstoffumlagerung unter Verlust eines Wasserstoffradikals gebildete Produkt zurückzuführen sein. Dieser Weg allein erklärt jedoch nicht die hohe Intensität des Peaks bei m/z 114.

Unter f werden in Schema 1 einige bisher nicht angesprochene, vom **4-Substituenten determinierte Fragmentierungsreaktionen** vorgeschlagen. Hierzu gehören ein radikalinduzierter Mechanismus der Isobuten-Abspaltung (vgl. f_1), der eventuell zusätzlich zum Weg e_2 zu der besonders hohen Intensität des Signals bei m/z 114 im Spektrum der Oxoverbindung 3 beiträgt. Dieser Weg schließt eine Ringöffnung zwischen C 3 und C 4 ein unter Bildung eines Radikalkations mit Positionierung der Ladung am Ketosauerstoffatom. Dieses Ion dürfte außerdem Ausgangspunkt für die Bildung des Kations m/z 83 sein, das unter H-Wanderung durch Abspaltung von C_4H_9NO entstehen kann. Eine ebenfalls für Ketoverbindungen charakteristische Fragmentierungsreaktion ist die Abspaltung von CO, die im Spektrum von TEMPON (3) ausgehend von Fragmention m/z 114 erkennbar ist (vgl. f_1).

Neben der **Eliminierung des 4-Substituenten** in Form von HR bzw. der entsprechenden RDA-Fragmente kann in den Spektren von **4** und **6** in Kombination mit dem Verlust einer Methylgruppe auch die Abspaltung von R ohne H-Wanderung festgestellt werden. Diese lässt sich aus dem distonischen Radikalkation, das nach Ringöffnung durch α -Spaltung resultiert, erklären (vgl. f₂).

Das Massenspektrum von TEMPOL-Benzoat (**5**) zeigt neben einer Reihe von Signalen, die auf die Fragmentierung der Tetramethylpiperidinnitroxid-Komponente des Moleküls zurückzuführen sind, auch die aus der Esterspaltung resultierenden typischen Peaks für Benzoesäure und deren Abbauprodukte (vgl. f₃) sowie M-C₆H₅COOH (vgl. b₂).

Fünfringnitroxide. Die untersuchten Fünfringnitroxide repräsentieren nach der Struktur der Ringsysteme Pyrrolidin- (**9**), Imidazolin- (**11** und **12**) sowie Imidazolidin- (**13**)-1-oxyle mit unterschiedlichem Substitutionsmuster. Deren Massenspektren sind zusammen mit Hinweisen auf die im Schema 2 vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismen in den Tabellen 12- 15 zusammengefasst.

In den Spektren der Piperidin- und Fünfringnitroxide sind einige Gemeinsamkeiten aber z.T. auch erhebliche Unterschiede erkennbar. Diese sollen im folgenden diskutiert werden.

Wie bei den Piperidinnitroxiden finden sich auch in den Spektren der Fünfringnitroxide (**M + 1**)-**Signale**, deren Höhe in einigen Fällen die des Isotopenpeaks übertrifft. Dementsprechend ist auch hier von einer partiellen Reduktion der Verbindungen in der Ionenquelle auszugehen, da eine Verunreinigung mit den korrespondierenden Hydroxylaminen aufgrund der unmittelbar von der MS erfolgten chromatographischen Reinigung der Proben ausgeschlossen werden kann.

Aus den Signalintensitäten lassen sich gewisse Unterschiede in der Stabilität der Molekülionen ableiten. Danach deutet sich folgende Stabilitätsreihenfolge der untersuchten Nitroxide unter den Bedingungen der EI-MS an: **4, 5 < 3, 11, 13 < 12 < 1, 2, 9**.

Primärfragmentierungen, die sowohl bei den Piperidin- als auch bei den Fünfringnitroxiden eine Rolle spielen, sind die Eliminierung des NO[•]-Fragmentes, eines Methylradikals und von C₃H₆NO. In welchem Umfang die für den massenspektrometrischen Zerfall der Piperidinnitroxide so bedeutsame Formaldehydabspaltung auch am Ringabbau der Fünfringnitroxide beteiligt ist, kann gegenwärtig nicht eingeschätzt werden. Sie sollte

zumindest an der Ausbildung der relativ intensiven Signale bei m/z 42 beteiligt sein (siehe unten). Die genannten Primärfragmentierungen besitzen für den Abbau der verschiedenen Verbindungen einen unterschiedlichen Stellenwert.

So hat die **NO[•]-Eliminierung** für die Fragmentierung der Nitroxide aus der Imidazolreihe eine dominierende Bedeutung und ist hier offensichtlich der energetisch günstigste Weg der Ringspaltung. Dies läßt sich vor allem durch die (M-30)- und (M-45)-Signale belegen, die bei den Verbindungen **11** und **12** zu den intensivsten Signalen des Spektrums gehören und auch bei Verbindung **13** relativ hoch sind. Das Auftreten der (M-45)-Peaks, die vor allem bei **11** und **12** sehr hoch sind, spricht indirekt dafür, daß die (M-30)-Signale hier tatsächlich vor allem der NO[•]-Eliminierung zuzuordnen sind, da die (M-45)-Ionen nur durch die Fragmentierung $M-(NO^{\bullet} + \bullet CH_3)$ zu erklären sind. Darüber hinaus wird über diesen Weg vermutlich eine Reihe weiterer Sekundärfragmentationen gebildet (vgl. Schema 2, a₁- a₄). Wegen mehrerer alternativer Möglichkeiten des Ringabbaus, insbesondere durch Retro-Diels-Alder-Reaktionen nach Ausbildung entsprechender Doppelbindungen (s.o.), kommt dem "NO[•]-Weg" demgegenüber bei den Piperidinnitroxiden eine geringere Bedeutung zu. Auch für den massenspektrometrischen Zerfall des Pyrrolidinnitroxids **9** spielt offensichtlich die Ringöffnung durch Abspaltung des NO[•]-Fragmentes eine geringere Rolle. Dafür sprechen die vergleichsweise geringe Intensität des (M-30)-Signals und das Fehlen eines (M-45)-Peaks, das allerdings durch begünstigte Konkurrenzreaktionen zu erklären wäre, wie z. B. die zusätzliche Eliminierung von Isobuten ($M-NO^{\bullet}-C_4H_8 \rightarrow m/z$ 100), oder von Propen über eine H-Wanderung ($M-NO^{\bullet}-C_3H_6 \rightarrow m/z$ 114) und des Carbonsäurefragments ($M-C_5H_9COOH \rightarrow m/z$ 42) bzw. weitere Reaktionsmöglichkeiten bei alternativer Lokalisierung der Ladung (vgl. Schema 2, a₁).

Die **Methylradikal-Eliminierung** scheint dagegen bei den Piperidinnitroxiden (s.o.) und auch beim Pyrrolidinnitroxid **9** eine etwas größere Bedeutung zu besitzen als das für die Nitroxide der Imidazolgruppe der Fall ist, die ausnahmslos sehr schwache (M-15)-Signale liefern. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß bei **9** durch die Abspaltung einer Methylgruppe die Ringöffnung durch α -Spaltung erleichtert wird. Ein indirekter Hinweis darauf ergibt sich durch die Eliminierung von $\bullet COOH$, die aus dem entsprechenden distonischen Radikalkation möglich wird und erst nach Verlust einer Methylgruppe festzustellen ist, während ein Ion ($M-\bullet COOH$) fehlt (vgl. Schema 2, b₁). Aus dem nach Ringöffnung durch α -Spaltung resultierenden Radikalkation läßt sich bei allen Verbindungen eine Reihe von

Sekundärfragmentationen herleiten (vgl. b_1 - b_4), wobei zumindest bei **9** auch eine zweite Methylradikal-Eliminierung nicht auszuschließen ist.

Die **Abspaltung von C_3H_6NO** aus dem Molekülion liefert bei nahezu allen Verbindungen relativ schwache Signale und fehlt bei **4** und **5** völlig. Lediglich in den Spektren der beiden Imidazolinnitroxide **11** und **12** lassen sich etwas intensivere (M-72)-Signale feststellen (vgl. Schema 2, c_1 - c_4).

Für den Fall, daß die **Abspaltung von Formaldehyd** bei den Fünfringnitroxiden für das (M-30)-Signal relevant sein sollte, dürfte das dabei entstehende Kation vor allem Ausgangspunkt für die Bildung des stickstoffhaltigen Kations m/z 42 sein (vgl. Schema 2, d).

Gravierende Unterschiede zwischen den untersuchten Verbindungen lassen sich hinsichtlich der **Mitwirkung der Substituenten** bei der Fragmentierung feststellen. Während bei allen anderen Nitroxiden die 4-Substituenten Ausgangspunkt z. T. quantitativ bedeutender Primärfragmentierungen sind (siehe auch oben), ist das bei den Verbindungen der Imidazolreihe nicht der Fall. In den Spektren von **11**- **13** sind die 4-Substituenten lediglich in Sekundärfragmentierungen involviert.

Dagegen geht von der Carboxylgruppe des Pyrrolidinnitroxides **9** offensichtlich ein wichtiger Abbauweg aus, der u.a. zu dem sehr intensiven Signal m/z 101 führt, für den der in Schema 2 unter e_1 dargestellte Mechanismus vorgeschlagen wird.

Bei dem relativ intensiven Signal m/z 72 im Massenspektrum von **13** sollte es sich um das $(C_3H_6NO)^+$ -Ion handeln, das nach Ringöffnung durch α -Spaltung entsteht (vgl. Schema 2, e_2). Warum dieses Fragmentation, das in geringerer Häufigkeit auch von den meisten Piperidinnitroxiden gebildet wird, nicht bei den anderen Fünfringnitroxiden auftritt, ist gegenwärtig unklar.

3.1.4 Kernresonanzspektroskopie (^1H - und ^{13}C -NMR)

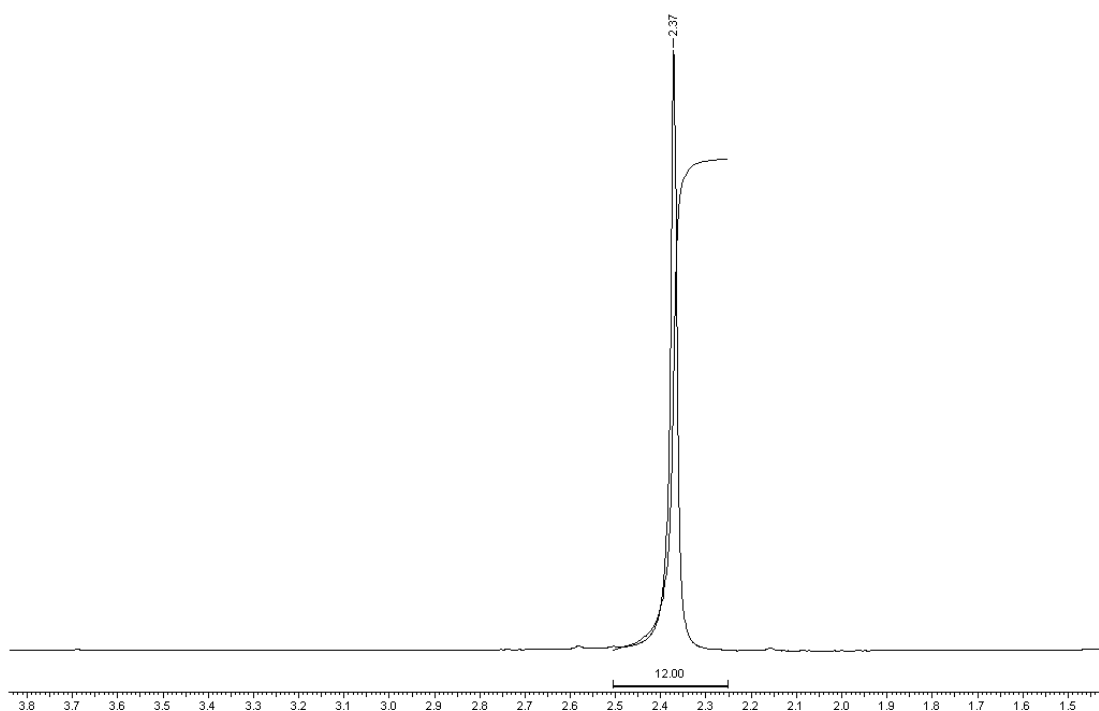
Um gebildete Reaktionsprodukte identifizieren zu können, bzw. um vermutete Strukturen zu belegen, wurden ^1H -NMR-Spektren aller Referenzsubstanzen (siehe 2.1, Abbildung 2 - 4) aufgenommen. Aufgrund des großen Substanzbedarfs für ^{13}C -NMR-Messungen wurden nur ausgewählte Verbindungen (**1**, **1C**) mit Hilfe der ^{13}C -NMR untersucht.

Die NMR ist eine Spektroskopie, die auf der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit magnetischen Atomkernen beruht. Gewöhnlich befinden sich die Kerne dabei in einem starken äußerem Magnetfeld. Das Hauptproblem bei der NMR-Untersuchung vom Nitroxylradikalen besteht nun in der Linienverbreiterung durch die magnetischen Momente der ungepaarten Elektronen. Die Signalverbreiterung wird durch eine Verkürzung der Relaxationszeiten der H-Kerne bei Anwesenheit von Nitroxiden ausgelöst [42]. Diamagnetische Verbindungen wie z.B. die korrespondierenden Hydroxylamine haben dagegen keinen nachweisbaren Einfluß auf die Relaxation [43]. Für bestimmte NMR- und MRI-Messungen wird dieser Effekt der Radikale gezielt ausgenutzt, indem Nitroxide als redoxaktive NMR-Kontrastmittel verwendet werden [44, 45].

In den Abbildungen auf den folgenden beiden Seiten sind die gemessenen ^1H -NMR-Spektren vom Nitroxid **1** sowie vom Hydroxylamin **1B**, sekundären Amin **1C** und vom Oxammoniumsalz **1D** dargestellt. Dafür wurden jeweils vergleichbare Konzentrationen der Untersuchungssubstanzen in deuteriertem Chloroform bzw. Methanol gelöst und vermessen. Diese NMR-Beispielspektren sind besonders interessant, da sich die Verbindungen ausschließlich bezüglich der 1-Position des Piperidinringes unterscheiden. Das Elektronenmoment der Nitroxylfunktion bewirkt dabei eine so starke Linienverbreiterung, daß die ^1H -Signale der $-\text{CH}_2$ -Gruppen, im Gegensatz zum Spektrum des diamagnetischen Hydroxylamins, nicht mehr beobachtbar sind (vgl. Abbildung 22). Eine gut nachvollziehbare Interpretation bezüglich Verschiebung, H-H-Kopplung und Intensität der ^1H -Signale erlaubt das Spektrum des sekundären Amins (Abbildung 23). Das ist u.a. durch die hohe Stabilität der Verbindung erklärbar. Sowohl beim korrespondierenden Hydroxylamin, als auch beim Oxammoniumderivat erfolgt eine partielle Bildung des Nitroxylradikals (die Lösung wird ESR-aktiv), die zu einer Signalverbreiterung bzw. zum Auftreten von neuen Signalen führt.

A

2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl



B

1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin

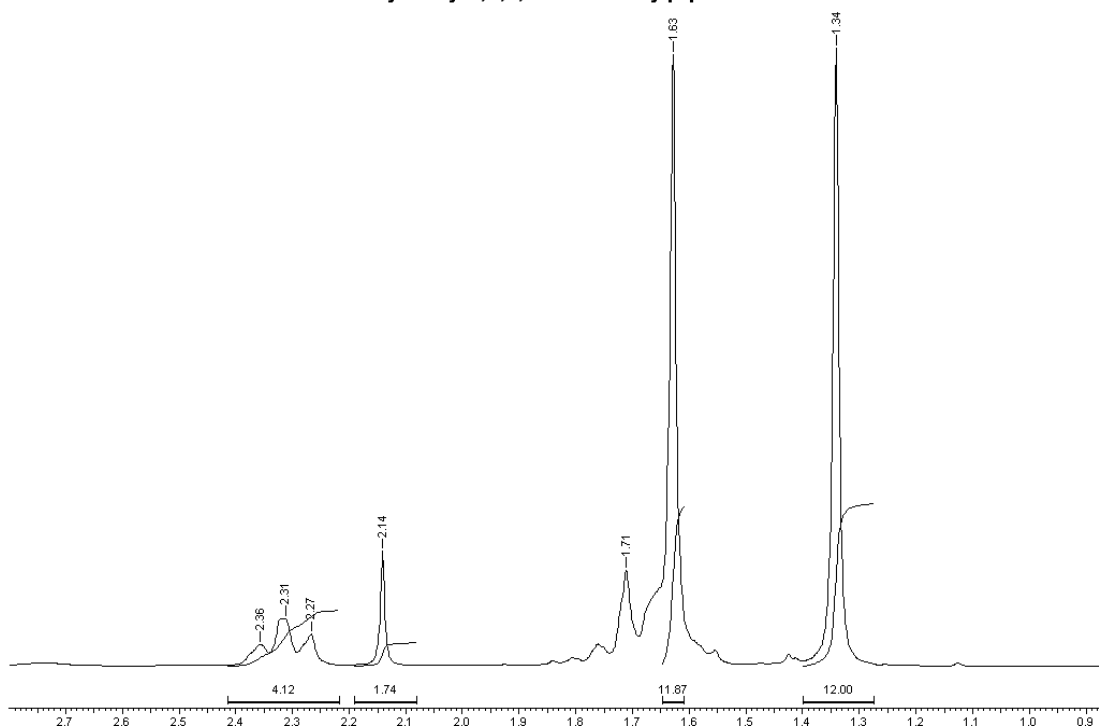
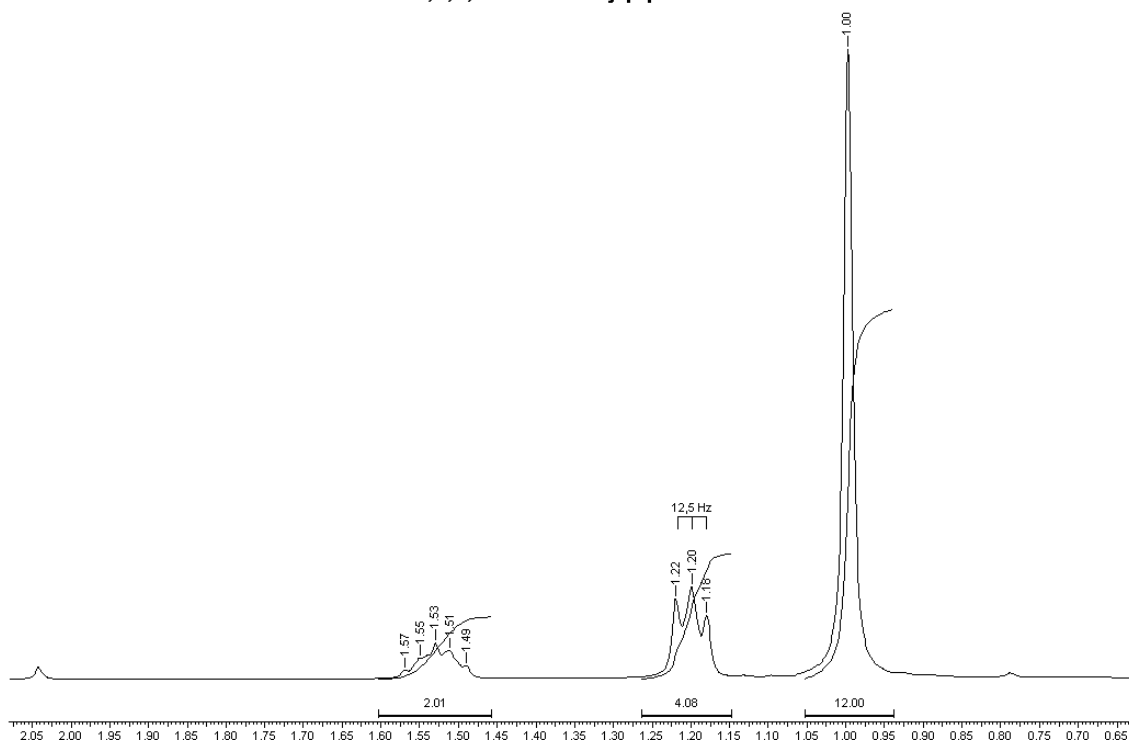


Abbildung 22: ^1H -NMR-Spektrum des Nitroxylradikals **1** (A) und des korrespondierenden diamagnetischen Hydroxylamins **1B** (B). Im Spektrum von **1B** zusätzlich auftretenden Signale zwischen 10,5 und 11,5 ppm sind auf die OH-Gruppe am Stickstoff zurückzuführen.

A

2,2,6,6-Tetramethylpiperidin



B

2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon

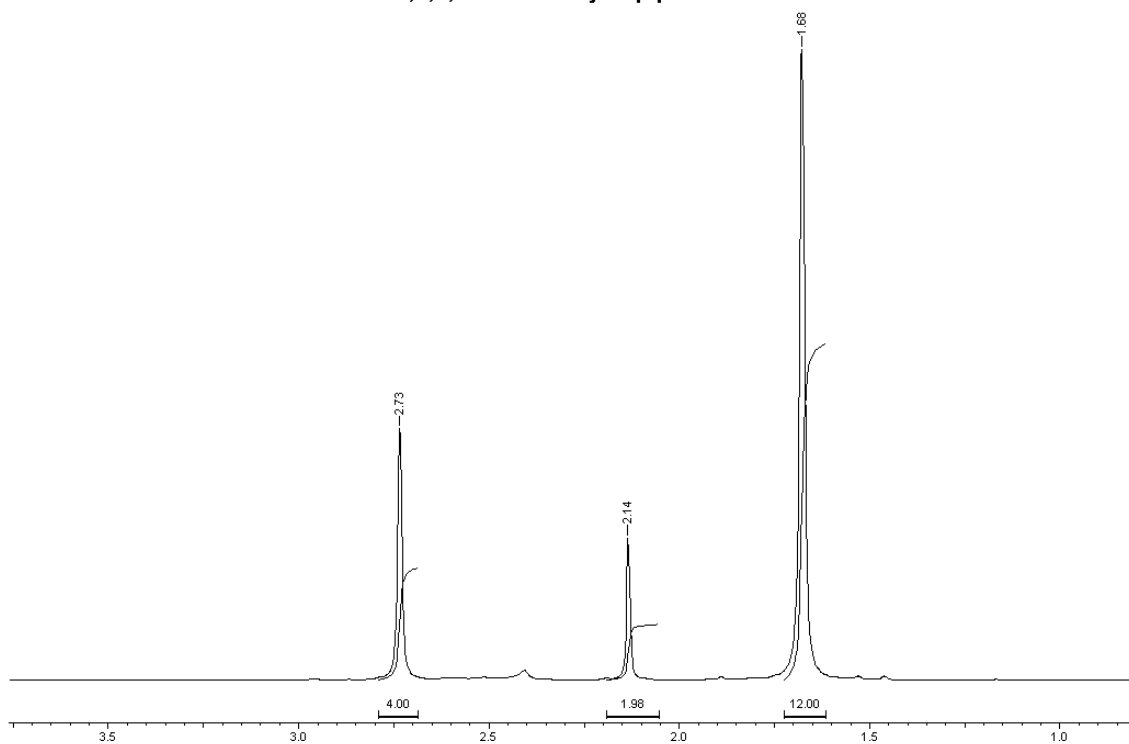


Abbildung 23: ^1H -NMR-Spektrum des sekundären Amins **1C** (A) und der Oxammoniumverbindung **1D** (B). Das Piperidonderivat besitzt ein weiteres NMR-Signal bei 9,7 ppm mit einer Intensität von annähernd 2.

Aus diesem Grunde wurden ^1H -NMR-Messungen im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen hauptsächlich zur Absicherung der Strukturen von diamagnetischen Metaboliten, Zersetzungs- und Syntheseprodukten eingesetzt, die vorher durch chromatographische, massenspektrometrische oder andere spektroskopische Methoden analysiert wurden. Die ^1H - sowie die ^{13}C -NMR-Messungen wurden ausschließlich bei Meßfrequenzen von 300 bzw. 75 MHz durchgeführt.

In der Abbildung 24 ist das ^{13}C -NMR-Spektrum (mit Protonen-Breitbandentkopplung) des sekundären Amins **1C** abgebildet.

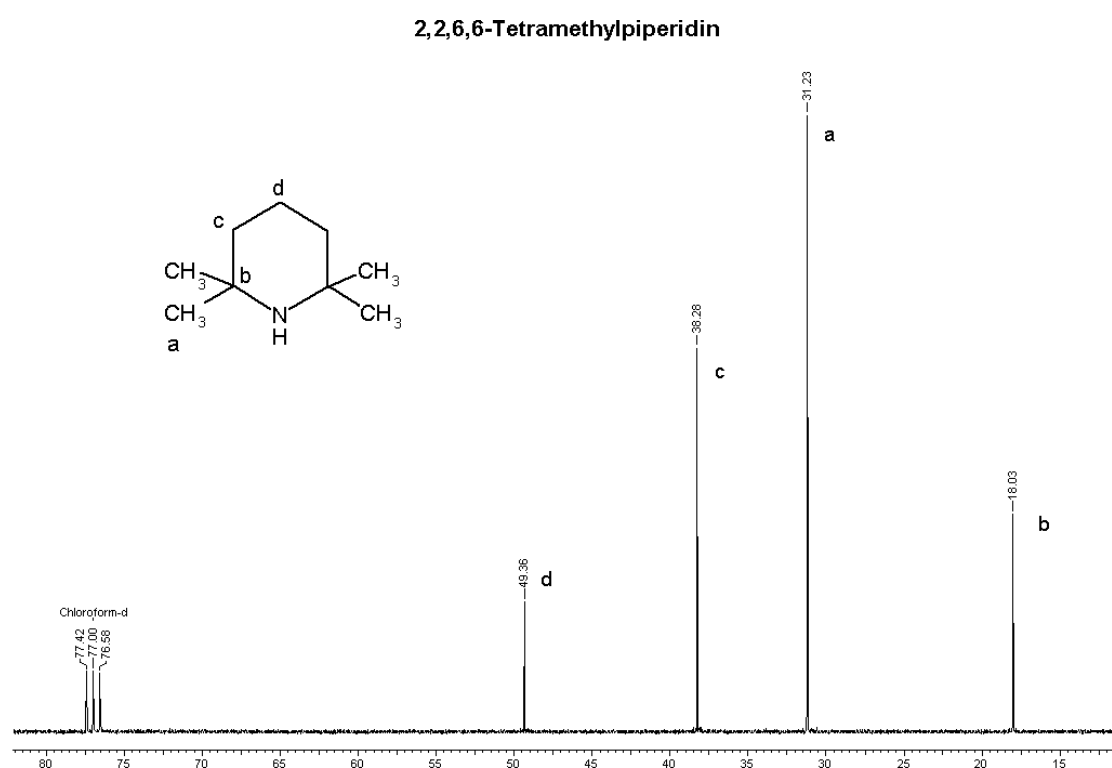


Abbildung 24: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **1C** (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin).

Bedingt durch die im Vergleich zur ^1H -Resonanz größeren chemischen Verschiebungen gibt es im ^{13}C -Spektrum der Untersuchungsverbindungen kaum Signalüberlappungen und die Signale lassen sich gut bestimmten C-Atomen zuordnen. Aufgrund der natürlichen Häufigkeit des ^{13}C -Isotopes von 1,1% im Isotopengemisch und der geringen gyromagnetischen Konstante ist das ^{13}C -Signal aber im Vergleich zum ^1H -Signal sehr schwach (ca. 1:6000 [46]). Spezielle Techniken wie Pulsverfahren, Spektrenakkumulation und Protonen-Breitbandentkopplungen sowie entsprechend größere Probenmengen erweisen sich als

notwendig für die Aufnahme zweifelsfrei interpretierbarer Spektren. Da im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen normalerweise nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung standen, wurde die ^{13}C -NMR-Technik nur in geringem Umfang eingesetzt. Sie diente, von wenigen Ausnahmen abgesehen, hauptsächlich zur Überprüfung von Ausgangsverbindungen und Vergleichssubstanzen sowie der Strukturaufklärung von Syntheseprodukten.

3.1.5 Infrarot-Spektroskopie (IR)

Durch Einsatz der IR-Spektroskopie sollten zusätzliche Informationen zur Identifizierung von Reaktionsprodukten und Metaboliten gewonnen werden. Hierzu wurden die IR-Spektren der vorhandenen Referenzsubstanzen (siehe 2.1, Abbildung 2 - 4) gemessen.

Das Europäische Arzneibuch gibt z.B. einen Wellenzahlbereich von $4000\text{--}667\text{ cm}^{-1}$ für die Aufnahme eines IR-Spektrums an. In diesem Wellenlängenbereich weisen viele organische Moleküle mit bestimmten funktionellen Gruppen charakteristische Absorptionsbanden auf. Da bei organischen Verbindungen nahezu alle IR-angeregte Schwingungen gekoppelt sind, ist es nur mit vergrößertem großen Aufwand möglich [47], die Schwingungsfrequenz und damit die Lage der entsprechenden IR-Bande vorauszuberechnen. Daher wurden die IR-Absorptionsmaxima der Referenzsubstanzen durch Vergleich mit tabellierten Werten [48] und gemessenen IR-Spektren von Vergleichssubstanzen mit charakteristischen Strukturmerkmalen empirisch zugeordnet.

Im Rahmen der IR-spektroskopischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß Nitroxylradikale ohne entsprechende funktionelle Gruppen, wie z.B. Sechsringe ohne spezielle Substituenten in 4-Stellung des Piperidinringes, nur wenig aussagekräftige Banden im IR-Spektren besitzen, die hauptsächlich auf C-H-Valenzschwingungen (um 3000 cm^{-1}) und C-H-Deformationsschwingungen (um $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) zurückzuführen sind.

Anhand des Auftretens bzw. des Fehlens charakteristischer IR-Linien lassen sich so z.B. Keto- (intensive Bande bei 1720 cm^{-1}), Hydroxyl- (breite Bande bei 3410 cm^{-1} , keine Bande von $1600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) und Carboxylfunktionen (intensive Bande bei 1690 cm^{-1}) bei Piperidinderivaten leicht unterscheiden (siehe Abbildung 25).

In der Literatur existieren Angaben, die eine Absorptionsbande der Nitroxide bei 1370 cm^{-1} zeigt, die auf eine Valenzschwingung der N-O-Funktion in Nitroxylradikalen zurückzuführen ist (Gallez *et al.* [39]). Informationen zur Intensität des IR-Signals liegen nicht vor. Anhand der gemessenen IR-Spektren konnte aber keine Bande eindeutig der Nitroxylradikalfunktion zugeordnet werden. Vermutlich liegt die N-O-Bande zwar im längerwelligen

Fingerprintbereich des IR-Spektrums, ist aber wenig intensiv und wird durch eine Vielzahl anderer Absorptionssignale in dem Wellenlängenbereich überlagert.

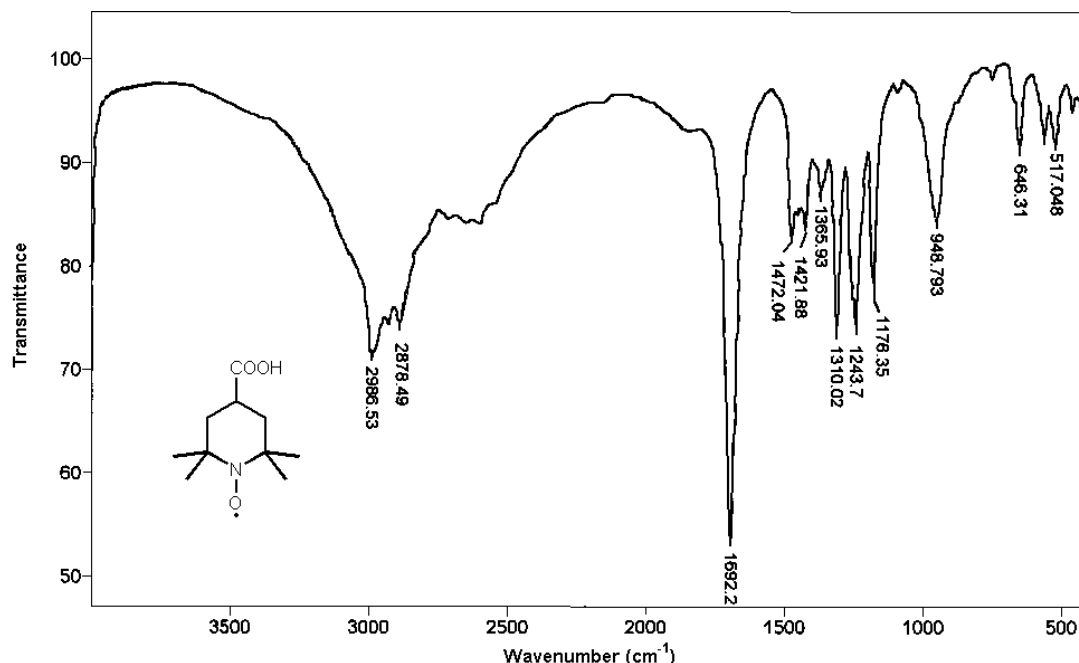


Abbildung 25: IR-Spektrum des Piperidinnitroxides **6** (Carboxy-TEMPO). Besonders charakteristisch ist hier die Valenzschwingung der Carbonylgruppe bei 1690 cm^{-1} . Die IR-Spektren wurden in Kaliumbromidpreßlingen als Differenzspektren zu Leerproben mit Hilfe eines FT-IR-Spektrometers (16fache Spektrenakkumulation) aufgenommen.

Aus diesem Grunde wurde die IR-Spektroskopie im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen ausschließlich zur Absicherung der Struktur von bestimmten funktionellen Gruppen bei Untersuchungssubstanzen und Reaktionsprodukten eingesetzt. Ein zusätzliches Problem entstand bei der Identifizierung von Biotransformationsprodukten, da diese Proben mit endogenen physiologischen Bestandteilen kontaminiert waren. Die meist nur sehr geringen Substanzmengen erschwerten die IR-Messung ebenfalls.

In Tabelle 16 sind die wesentlichen IR-Banden der untersuchten Verbindungen und die zugeordneten Molekülschwingungen aufgeführt. In dieser Aufstellung wurden ausschließlich starke (s) und mittelstarke (m) IR-Banden berücksichtigt. Dabei wurden die IR-Spektren als Differenzspektren zu Leerproben mit Hilfe der FT-IR gemessen. Dabei wurde eine vielfache Spektrenakkumulation (mind. 15) durchgeführt, um das S/N-Verhältnis zu verbessern. Neben Kaliumbromidpreßlingen mit den entsprechenden Proben kamen auch Flüssigkeitsfilme aus Tetrachlorkohlenstoff zum Einsatz.

Alle Untersuchungen wurden mit Hilfe des FT-IR-Spektrometers FTS 135 (Bio-Rad/ Digilab Analytical Instruments) durchgeführt.

Tabelle 16: Charakteristische IR-Absorptionsbanden der Untersuchungssubstanzen.

IR-Bande (cm^{-1})	Schwingung (ν / δ) ¹	Molekülstruktur
3630	ν	=CH ₂ -OH von <u>2</u>
3400-3500	ν	-OH (dimer und polymer assoziiert) von <u>2</u>
3390	ν	-NH ₂ von <u>11</u>
3250-3450	ν	=NH von sekundären Aminen (teilweise sehr breite Banden)
2940-2990	ν	C-H von -CH ₃
2890-2920	ν	C-H von -CH ₂ -
2870-2900	ν	durch Wasserstoffbrücken assoziiertem -OH in -COOH von <u>6</u> und <u>9</u>
1824	ν	=C=O von Anhydrid <u>10</u>
1730	ν	=C=O in -COOH von <u>9</u>
1720-1725	ν	=C=O von <u>3</u>
1695/1724	ν	=N ⁺ =O von Piperidonderivat <u>1D</u>
1692	ν	=C=O in -COOH von <u>6</u>
1677	ν	=C=N- von <u>11</u>
1650	ν	=C=NH vom sekundären Amin <u>1C</u> , <u>2C</u> und <u>4C</u>
1613	δ	-NH ₂ von <u>11</u>
1460-1470	δ	C-H von -CH ₂ -
1210	δ	C-H von -C(CH ₃) ₃

¹ ν Valenzschwingung, δ Deformationsschwingung

3.1.6 Differentielle Puls Polarographie (DPP)

Im Rahmen der Arbeit sollten durch Untersuchung des elektrochemischen Reduktionsverhaltens der Nitroxylradikale neue Erkenntnisse zu Reaktionsmechanismen der Untersuchungssubstanzen gewonnen werden. Weiterhin sollte der Einfluß von Ringstruktur und Substituenten der Nitroxide sowie des pH-Wertes der Lösung auf die chemische und biochemische Stabilität der Radikale untersucht werden. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde die Differentielle-Puls-Polarographie (DPP) eingesetzt.

Die DPP stellt eine besondere Form der klassischen Polarographie dar, bei der eine Strom-Spannungskurve, das Polarogramm, erhalten wird. Die DPP führt zu einer Senkung der Nachweisgrenze auf ca. $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ im Gegensatz zur konventionellen Polarographie.

Folgende Meßparameter wurden bei der Durchführung der DPP verwendet:

Gerät:	Polarograph POL 150 mit MDE 150 + Software Tracemaster 5
Arbeitselektrode:	Quecksilber-Tropfelektrode
Referenzelektrode:	Ag/AgCl; 3N KCl
Hilfselektrode:	Pt-Draht
Schrittweite:	1 s
Schrittamplitude:	10 mV
Pulsamplitude (ΔE):	- 50 mV
Analytkonzentration:	$4,55 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

Elektrolyt: Britton-Robinson-Puffer (kalibriert mit der Wasserstoffelektrode). Die Ionenstärke wurde durch Zugabe von KCl konstant gehalten. Lösungsmittel: Aqua bidest., ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln.

Die Ergebnisse der durchgeführten elektrochemischen Untersuchungen sind im Kapitel 5.2. ausführlich dargestellt und diskutiert.

3.1.7 Chromatographische Verfahren

Durch den Einsatz von chromatographischen Verfahren (HPTLC und GC) sollten Informationen zur Struktur und zur Reinheit der untersuchten Verbindungen gewonnen werden. Hierzu wurden neben der Cochromatographie (angewendet bei der GC) hauptsächlich eine eigens erstellte UV/VIS-Remissionsspektrenbibliothek von Referenzsubstanzen (auf HPTLC-Platten) genutzt.

Da die untersuchten Nitroxide, mit Ausnahme des Benzoates 5, keine konjugierten Bindungssysteme in den Molekülen enthalten, ergeben sich bezüglich Struktur und Reinheit wenig aussagekräftige UV/VIS-Spektren. Alle geprüften Verbindungen zeigen ein Absorptionsmaximum im Bereich von 240 - 250 nm. In Verbindung mit den gemessenen R_f -

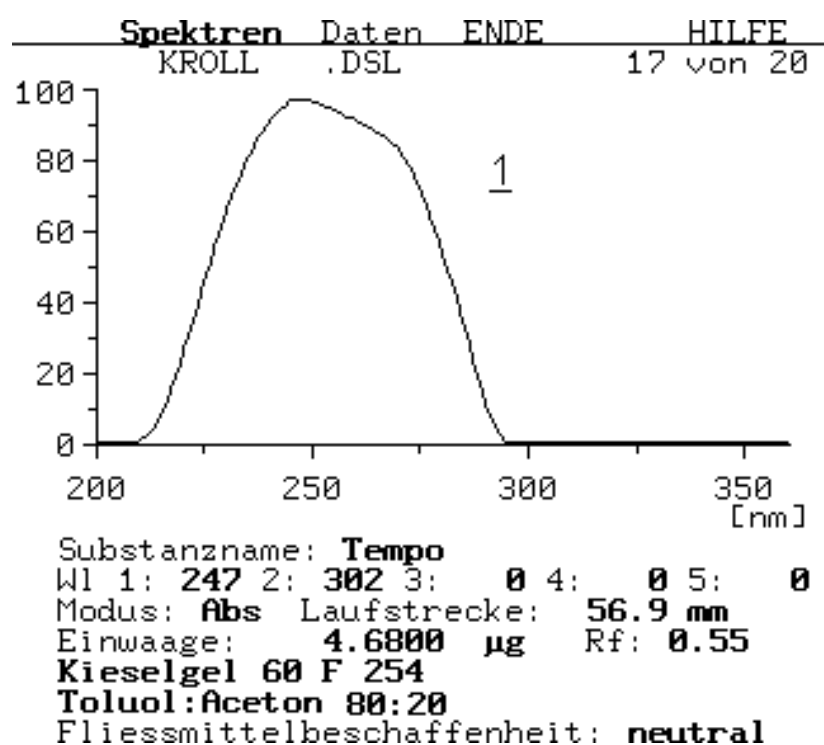
Werten lassen sich Rückschlüsse auf die Identität der untersuchten Verbindungen ziehen (Beispiele der Remissionsspektren: siehe Abbildung 26).

Bei Auswertung der HPTLC-Platten wurden die Remissionsmessungen mit Hilfe des TLC-Scanners II von CAMAG (Auswertesoftware CATS) durchgeführt. Für den UV-Bereich wurde eine Deuteriumlampe verwendet, während für den VIS-Bereich eine Wolframlampe zum Einsatz kam. Für die Spektrenaufnahme wird die Strecke von der Auftragsposition der Substanz bis zur Laufmittelfront auf der DC-Platte mit einem Lichtstrahl definierter Wellenlänge und einer Meßgeschwindigkeit von 4 mm/ s abgetastet und die Minderung der Remission zum Nullabgleich bestimmt. Wird dabei ein Peak detektiert, kann anschließend an dieser Stelle der DC-Platte (def.= X; Y-Werte) das Remissionssignal bei veränderter Einstrahlungswellenlänge nachgewiesen werden. Damit bieten sich eine neue analytische Möglichkeit, die es gestattet, komplette UV/VIS-Spektren jeder untersuchten Verbindung direkt auf der HPTLC-Platte (in situ) zu registrieren [49]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, über den Vergleich der Spektren von drei verschiedenen Positionen eines Peaks (Peakanstieg, Maximum und Peakabfall) eine Information zur Güte der chromatographischen Trennung und zur Reinheit der entsprechenden Substanz zu erhalten.

Da unterschiedliche stationäre HPTLC-Phasen sowie verschiedene Chargen einer stationären Phase die Lage der Remissionsspektren ebenfalls beeinflussen können, wurden routinemäßige Kontrollmessungen der Spektren bei Anwendung neuer HPTLC-Platten durchgeführt.

Die angelegte Spektrenbibliothek enthält umfangreiche Spektren aller untersuchten Nitrooxide, Zersetzungsprodukte, Metaboliten sowie häufig auftretender Kontaminationen (wie z.B. Weichmacher von Plastikvials und Laufmittelverunreinigungen). Damit liegen schon nach einer HPTLC-Untersuchung erste Hinweise zur Struktur der chromatographierten Verbindungen vor und eine Verwechslung mit Artefakten kann ausgeschlossen werden. Aufgrund ihrer sehr guten Eignung wurde die HPTLC, neben der quantitativen Analytik, im großem Umfang auch als Screeningmethode bei der Untersuchung von Reaktionsprodukten und Metaboliten von Nitroxiden eingesetzt.

A



B

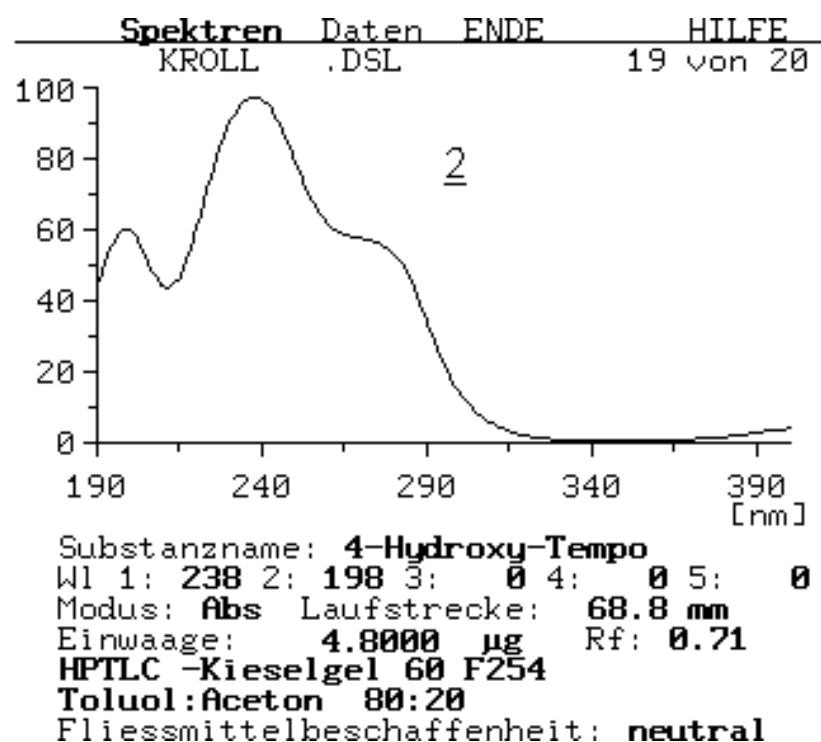


Abbildung 26: Gemessene UV-Remissionsspektren der Piperidinnitroxide **1** und **2** auf MERCK HPTLC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ nach chromatographischer Entwicklung.

3.2 Quantitative Analytik

3.2.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

Für den analytischen Nachweis und speziell die Quantifizierung von Nitroxiden, Reaktionsprodukten und Metaboliten wurden die Vorteile der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) genutzt. Die Vorteile der HPTLC im Gegensatz zur klassischen DC wurden von *Frey und Zieloff* [47] ausführlich diskutiert.

Bei den durchgeführten Untersuchungen kamen Merck® HPLTC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator und C-18 modifizierte Kieselgelplatten 10cm•10cm und 10cm•20cm zum Einsatz. Die Probenauftragung erfolgte unter Einsatz der strichförmigen Aufsprühtechnik mit dem Linomat IV (CAMAG) bzw. dem Probenautomat III (CAMAG). Bei der chromatographischen Entwicklung wurde sowohl die aufsteigende Technik (Doppeltrogkammer) unter Kammersättigung, als auch die horizontale Methode (Horizontalentwicklungskammer) im Sandwichsystem verwendet. Für die Quantifizierung kam ausschließlich die Horizontalentwicklungskammer (CAMAG) ohne Gegenplatte zum Einsatz, da hier durch den sehr kleinen Raum über der Probe und die große Grenzfläche Laufmittel/ Gasraum in kurzer Zeit eine vollständige Sättigung der Atmosphäre erreichbar ist. Als Standardfließmittel auf polarem Kieselgel 60 Phasen wurde verschiedene Laufmittel, wie z.B. Laufmittel I (Toluol:Aceton:Methanol 7:2:1) eingesetzt, während auf apolaren RP-Phasen Methanol-Puffer-Mischungen (Phosphatpuffer 50 mmol•l⁻¹; pH 5, 7, 9) zum Einsatz kamen. Die R_F-Werte von Referenzsubstanzen (Kieselgel 60 Phase) sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Tabelle 17: R_F-Werte auf Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC-Platten.

Verbindung	Laufmittel I	Laufmittel II	Laufmittel III
1 (TEMPO)	0,85	0,68	0,79
2 (TEMPOL)	0,52	0,18	0,31
3 (TEMPON)	0,05	0	0
4 (TEMPAMIN)	0,25	0,05	0,11
5 (TEMPOL-benzoat)	0,89	0,67	0,80
6 (Carboxy-TEMPO)	0,49	0,17	0,30
1B (TEMPOH)	0,51	0,35	0,41
2B (TEMPOLH)	0,48	0,14	0,27
1C (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin)	0,28	0,12	0,16

¹ I (Toluen : Aceton : Methanol 7 : 2 : 1), ² II (Toluen : Aceton 9 : 1), ³ III (Toluen : Aceton 8 : 2)

Die Fließmittel I - III erwiesen sich als geeignet hinsichtlich ihrer Selektivität auf die HPTLC-Trennung von Nitroxiden und potentiellen Reaktionsprodukten wie Hydroxylaminen und

sekundären Aminen. Sowohl die qualitative Analyse, als auch die quantitativen Auswertungen der entwickelten Chromatogramme, wurden mit Hilfe der Remissionsmessung bei 254 nm unter Nutzung des TLC-Scanners II (CAMAG) und bei Verwendung der Auswertesoftware CATS durchgeführt. Die verwendeten Standardmeßparameter sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Parameter der Remissionsmessung mittels TLC-Scanners II (CAMAG).

	Meßparameter:
Lampe	Deuterium (UV)/ Wolfram (VIS)
Nutzbare spektrale Bereich	190- 800 nm
Monochromator-Bandbreite	10 nm
Spaltlänge	4 mm
Meßgeschwindigkeit	4 mm/ s (Hochauflösung)
Schrittauflösung	20 µm (Hochauflösung)
Offset	10 %
Empfindlichkeitseinstellung des Photomultipliers (SENS)	0 (Auto)
Signalverstärkung (SPAN)	20
SENS-SPAN-Optimierung	Ja
Nullabgleich	1• pro HPTLC-Platte
Wellenlängen-Schrittweite der Spektrenmessung	5 nm
Komplexität der Kalibrierdatenerfassung	"Hoch" und "Niedrig"

Die Quantifizierung erfolgte sowohl über die Peakhöhe, als auch über die Peakfläche mit Hilfe entsprechend mitgeführter Standardbahnen in drei verschiedenen Konzentrationen (jeweils als Dreifachauftragung). Bedingt durch die Besonderheiten der Remissionsmessung ist die Erstellung einer linearen Kalibrierfunktion nur bei niedrigen Konzentrationen und in sehr engen Konzentrationsbereichen möglich. So war häufig eine nichtlineare Regressionsanalyse notwendig, die mittels Polynomregression oder der MICHAELIS-MENTEN-Funktion durchgeführt wurde.

Die verwendeten stationären Phasen, die Laufmittel sowie die jeweiligen chromatographischen Bedingungen beeinflussen sowohl den Variationskoeffizienten als Maß für die Präzision der Methode, als auch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Bei Einsatz der quantitativen HPTLC auf Merck-HPTLC Kieselgel F₂₅₄ - Phasen unter Verwendung von Laufmittel II (siehe Material und Methoden) beträgt die Bestimmungsgrenze der Piperidinnitroxide 5- 25 ng / Spot mit Variationskoeffizienten von 3- 8 % in Abhängigkeit von der Konzentration der Verbindungen. Die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze wird bei der quantitativen HPTLC in weitaus größerem Maße als z.B. bei der HPLC durch äußere Parameter beeinflusst. So führen schon geringe Veränderungen in der Laufmittelzusammensetzung, in der Kammersättigung oder eine ungenügend ausgerichtete

Horizontalkammer zu veränderten Meßwerten.

Die Ergebnisse der Quantifizierung mittels HPTLC sind im folgendem beispielhaft für den Benzoessäureester **5** dargestellt (siehe Abbildungen 27 und 28).

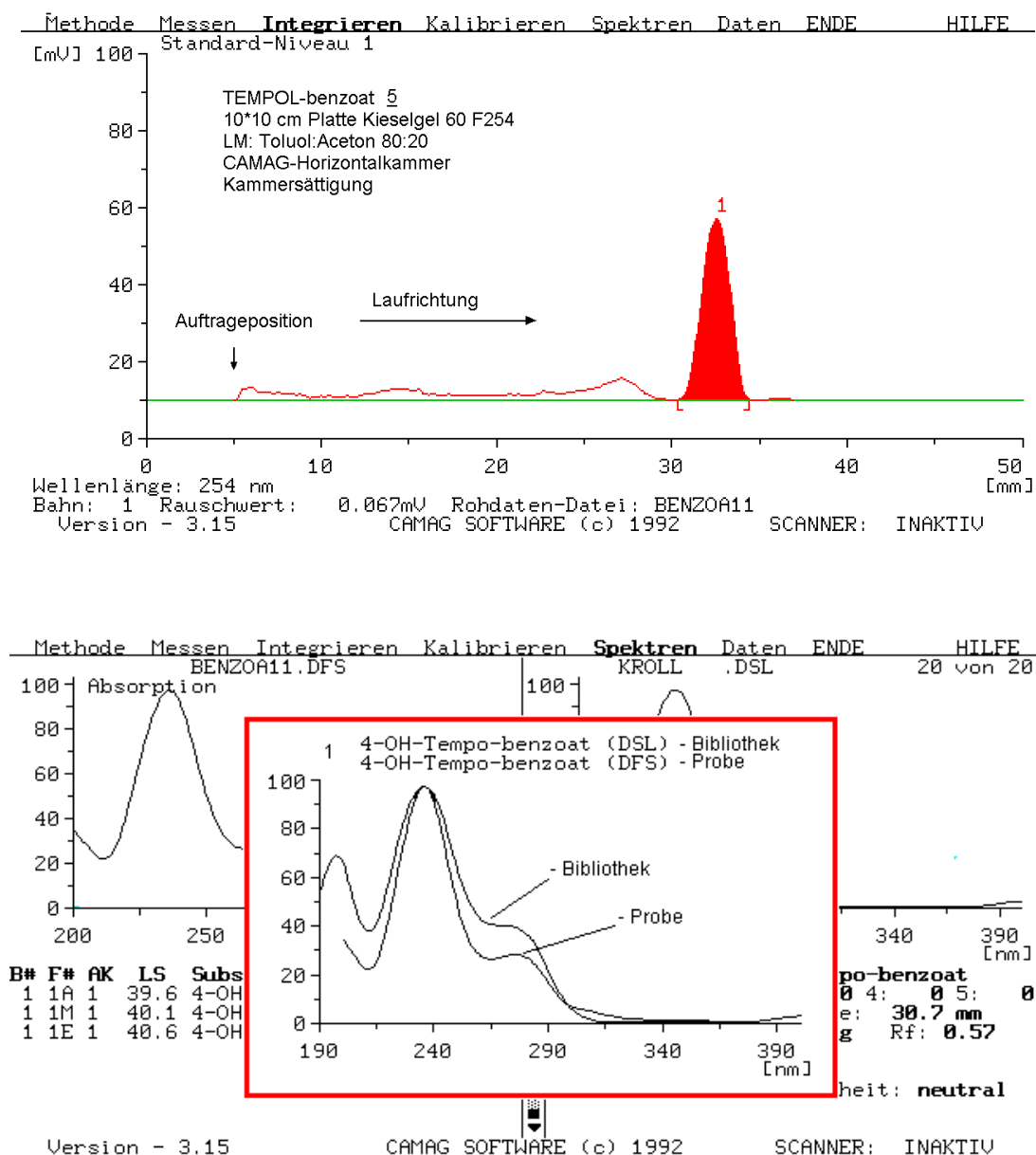
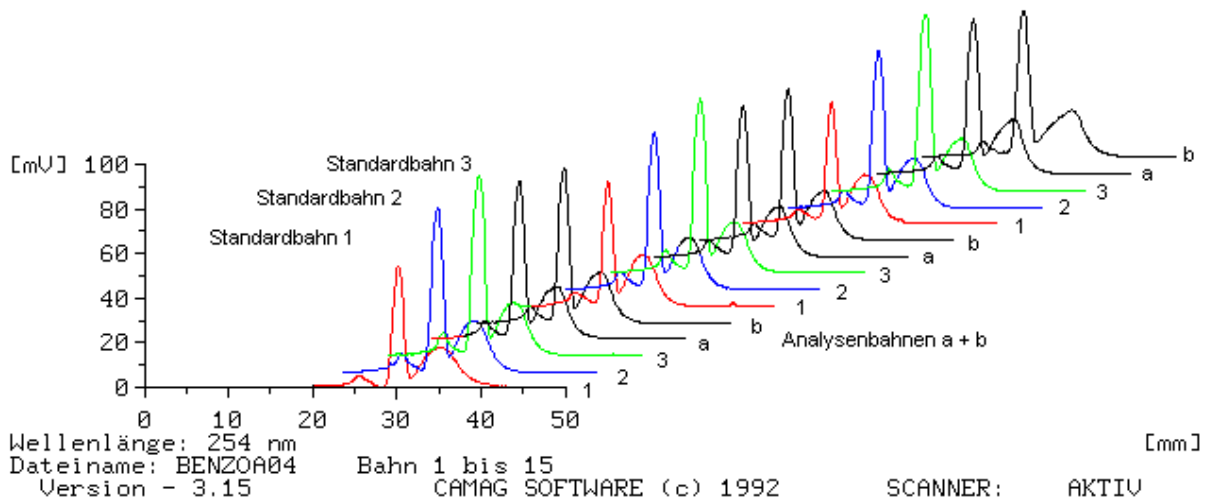
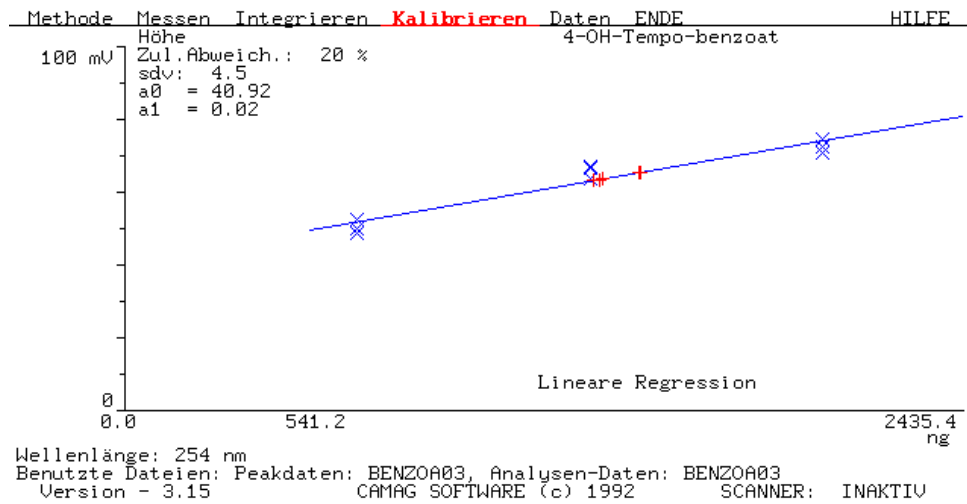


Abbildung 27: HPTLC-Chromatogramm von Nitroxid **5** und Identifizierung des entsprechenden Peaks mittels UV-Remissionsspektrum (von 200-400 nm) und erstellter Spektrenbibliothek.



A



B

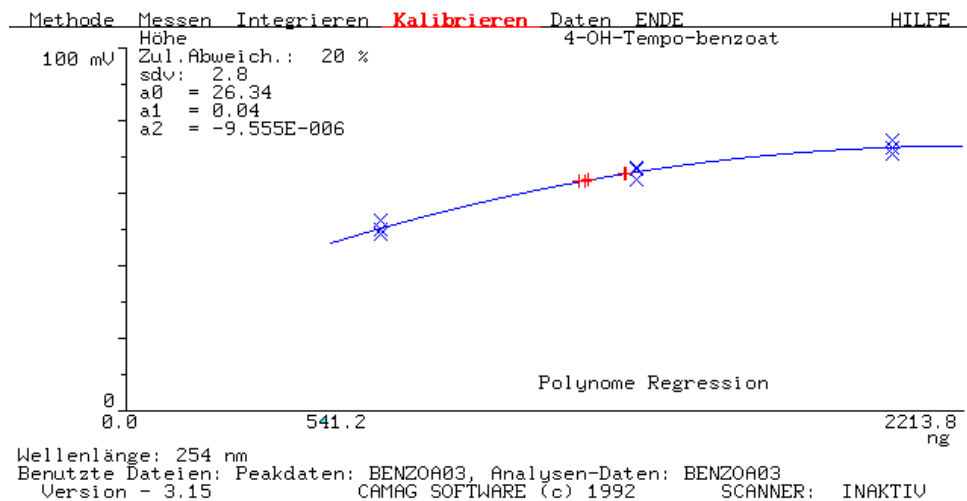


Abbildung 28: Quantifizierung von Nitroxid 5 (1,250 µg/spot; n= 3) über die Peakhöhe mittels (A) linearer Regression und (B) Polynomregression (2.Ordnung).

Die Ergebnisse der Quantifizierung von Nitroxid **5** mittels quantitativer HPTLC (**5** aufgetragen: 3•3 Standardbahnen; Analyse: 6•1,250 µg/spot) nach linearer Regression bzw. Polynomregression sind in Tabelle 19 gegenübergestellt.

Tabelle 19: Ergebnisse der Quantifizierung von **5** mittels HPTLC.

	lineare Regression	Polynomregression
Höhe:	1,419 µg ± 4,7%	1,249 µg ± 4,4 %
Fläche:	1,317 µg ± 5,8%	1,205 µg ± 5,6 %

Die Auswertung der gemessenen Peakhöhe mit Hilfe der Polynomregression führt zu richtigen Ergebnissen bei gleichzeitig guter Präzision. Die Entscheidung, ob eine Quantifizierung über Höhe oder Fläche, bzw. mittels Linearer oder Polynomregression durchgeführt wird, wurde jeweils nach erfolgter Kurvenanpassung nach dem Kriterium der kleinsten Standardabweichung getroffen. D.h. für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert (aus drei Meßwerten) mit dem kleinsten Variationskoeffizient verwendet. Diese Vorgehensweise ist bei der quantitativen HPTLC zulässig, da die entsprechenden Standards jeweils direkt auf der Platte mitgeführt werden.

Eigene Voruntersuchungen haben außerdem gezeigt, daß bei der Anwendung der HPTLC, der Einfluß von Luftsauerstoff sowie von aktiven Oberflächen und Schwermetallspuren in der stationären HPTLC-Phase auf die Stabilität von Nitroxylradikalen, Reaktionsprodukten und Metaboliten, während der chromatographischen Trennung zu berücksichtigen ist.

3.2.2 Gaschromatographie (GC)

Aufgrund der Flüchtigkeit der Nitroxide sowie der entsprechenden Hydroxylamine und sekundären Amine erwies sich die Gaschromatographie (GC) als sehr gut geeignete Methode für qualitative und quantitative Untersuchungen. Für die Arbeiten wurde ein Hewlett Packard 5890 Series II -Gaschromatograph mit einer HP-5 Kapillarsäule verwendet, der mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) sowie einem Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD) gekoppelt war. Darüber hinaus wurde insbesondere für die Identifizierung von Reaktionsprodukten die GC-MS eingesetzt (vgl. 3.1.3).

Eine Derivatisierung der neutralen Verbindungen war nicht notwendig. Die weniger flüchtigen Verbindungen mit Carboxylfunktionen wurden vor der Injektion jeweils mit MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid) silyliert. Das Silylierungsvermögen von MSTFA ist sehr stark. Außerdem stört das auftretende Nebenprodukt der Silylierungsreaktion (N-Methyltrifluoracetamid) durch seine große Flüchtigkeit und die damit kurze Retentionszeit die

Peakdetektion bei der GC-Trennung nicht [50].

Die quantitative Bestimmung mittels GC-FID erfolgte unter Verwendung eines internen Standards (Thymol bzw. 2-Aminopyridin). Die verwendeten Standards besaßen ähnliche physikochemische Eigenschaften wie die untersuchten Verbindungen, sind aber gegenüber Nitroxiden und potentiellen Metaboliten inert.

Die Quantifizierung erfolgte über das Verhältnis der Peakflächen nach Umrechnung mit Hilfe eines ermittelten Flächenkorrekturfaktors f . Der Faktor f berücksichtigt den unterschiedlichen Signalresponse der einzelnen Verbindungen im GC-Detektor bei der Quantifizierung und wurde für jede untersuchte Verbindung ermittelt. Die Faktoren für die quantitative GC-Bestimmung f wurden unter Verwendung entsprechender Stammlösungen ermittelt und nach folgender Formel berechnet:

$$f = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{interner Standard}} \cdot \text{Masse}_{\text{Komponente}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Komponente}} \cdot \text{Masse}_{\text{interner Standard}}}$$

Die Bestimmungsgrenze (Definition siehe 3.1) der untersuchten Verbindungen betrug 0,5 - 2 µg/ ml (split-Verhältnis 1:10). Die Nachweisgrenze (Definition siehe 3.1) lag um den Faktor 10- 20 unter der Bestimmungsgrenze. Die Verwendung der Splitless-Option erbrachte keine Vorteile, da sich die detektierten Peakflächen zwar vergrößerten, gleichzeitig aber die Peaksymmetrie und somit die Integration verschlechterte. Durch Überladung der Kapillarsäule trat ein ausgeprägtes Peaktailing auf. Bedingt durch die Auswertesoftware des GC-Geräteherstellers lassen sich sehr kleine Peaks, auch unter Verwendung der manuellen Integrationsoption, nicht mehr exakt und reproduzierbar integrieren. Auf eine Auswertung dieser schwachen Signale wurde deshalb verzichtet.

Durch Verwendung eines NP-Detektors konnte die Bestimmungsgrenze um annähernd eine Zehnerpotenz im Vergleich zum FI-Detektor auf 100- 500 ng/ ml abgesenkt werden. Bedingt durch den nichtlinearen Signalresponse des NP-Detektors in niedrigen Konzentrationsbereiche und die hohe Anfälligkeit der Rubidiumperle gegen Verschmutzungen konnte der Empfindlichkeitsvorteil des NP-Detektors bei den anschließenden Arbeiten praktisch nicht genutzt werden. Für die quantitativen GC-Untersuchungen zur Stabilität, Reaktivität und Biotransformation von Nitroxylradikalen wurde deshalb ausschließlich der FI-Detektor eingesetzt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Parameter der gaschromatographische Bestimmung von Referenzsubstanzen.

Verbindung	GC-Temperatur	t _R [min]	Korrektur- faktor f	Bestimmungsgrenze [µg/ ml] (split 1:10-15)		Nachweisgrenze [µg/ ml] (split 1:10-15)	
				FID	NPD	FID	NPD
1	140°C	4,5	1,76	1,9	0,1	0,6	0,05
1B	140°C	4,4	1,78	1,8	0,1	0,5	0,1
1C	140°C	3,2	1,14	3,4	0,2	1	0,1
2	150°C	5,9	1,52	2,4	0,2	0,7	0,05
	140°C	7,6	1,55	2,4	0,1	0,7	0,05
2B	150°C	5,8	1,59	1,5	0,1	0,7	0,05
	140°C	7,4	1,69	1,6	0,1	0,6	0,05
2C	120°C	5,8	2,17	2,2	0,1	0,7	0,1
3	150°C	4,6	2,80	2,2	0,4	0,7	0,05
4	140°C	7,5	1,46	2,1	0,3	0,6	0,05-
5	Gradient ^{1a}	21,8	1,34	0,9	0,1	0,4	0,05-
6	+MSTFA ²	13,3	1,95	0,9	0,1	0,2	0,05
9	Gradient ^{1b}	14,7	1,17	1,9	0,1	0,8	0,05
	+ MSTFA ²	8,9	1,65	1,5	0,2	1	0,05
11	160°C	4,4	1,43 ³	1,5	0,2	1	0,1
	Gradient ^{1c}	5,3	1,50	1,4	0,2	1	0,1
12	150°C	3,4	1,12	0,7	0,1	0,2	0,05
	140°C	3,6	1,15	0,7	0,1	0,2	0,1
12B	140°C	3,8	1,16	0,8	0,1	0,2	0,05
13	150°C/ Gradient ^{1d}	4,2 (10,4)	1,05	0,6	0,1	0,2	0,05

Temperaturprogramm: ^{1a} 3 min bei 80°C, 6°C/min bis 150°C, 15°C/min bis 280°C, 5 min bei 280°C; ^{1b} 3 min bei 80°C und 6°C/min bis 280°C; ^{1c} 2 min 120°C, dann 15°C/min - > 280°C; ^{1d} 3 min bei 80°C, 3°C/min bis 150°C, 6°C/min bis 250°C, 2 min bei 250°C;

Silylierung mit MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid)

³ Interner Standard: 2-Aminopyridin statt Thymol

3.3 Extraktionsmethoden

Die Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode im Rahmen der Probenvorbereitung ist von zentraler Bedeutung für die Zuverlässigkeit der anschließenden analytischen Untersuchungen. Bedingt durch den großen Einfluß von Luftsauerstoff, pH-Wert und Kontaminationen mit Übergangsmetall-Ionen auf die Stabilität von Untersuchungsverbindungen und Reaktionsprodukten, ergaben sich besondere Anforderungen an die Extraktionsmethode. Bei allen Untersuchungen wurde die Extrahierbarkeit aus wäßriger Pufferlösung (pH= 5, 7, 9 und 11) überprüft. Der alkalische pH-Wert hat keinen Einfluß auf die Stabilität und die Wiederfindungsrate der Nitroxide (siehe Kapitel 3.3.1), gestattet jedoch zusätzlich die quantitative Erfassung von sekundären Aminen.

3.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden die Substanzen in Pufferlösungen gelöst (Endkonz. $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, isotonischer PBS-Puffer, pH= 9) und mit dem Extraktionsmittel extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet, eingeeengt und in MeOH aufgenommen. Die Substanzen wurden mittels HPTLC quantifiziert. Darüber hinaus wurde die Einsatzmöglichkeit von MERCK Extrelut[®]1, Extrelut[®]3 und Extrelut[®]20-Säulen für die modifizierte Flüssig-Flüssig-Extraktion überprüft. Die Ergebnisse für die untersuchten Piperidinderivate bei Verwendung von Extrelut[®]3-Säulen sind in der folgenden Tabelle 21 zusammengefaßt.

Tabelle 21: Wiederfindungsraten für die Flüssig-Flüssig-Extraktion bei pH= 9 mittels Extrelut[®]3-Säulen und Chloroform bzw. Ethylacetat (EA) ($\bar{x} \pm s\%$; n = 5).

Verbindung	Wiederfindung [%] Extraktionsmittel: CHCl_3	Wiederfindung [%] Extraktionsmittel: EA
<u>1</u>	99,2 (3,5)	92,6 (4,7)
<u>2</u>	104,4 (4,9)	89,5 (9,8)
<u>3</u>	97,4 (1,9)	91,6 (11,6)
<u>4</u>	97,9 (4,1)	82,3 (7,9)
<u>5</u>	95,8 (4,8)	94,3 (4,6)
<u>1C</u>	82,1 (4,8)	85,1 (3,4)
<u>2C</u>	95,8 (1,7)	96,2 (3,3)

Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Extrelut[®]-Säulen wurde ein definiertes Volumen der zu extrahierenden Lösung auf eine Kieselgurmatrix aufgebracht. Nach entsprechender Equilibrierungszeit (15 - 30 min) wurde diese Kieselgurmatrix mit einem unpolaren Extraktionsmittel (Ethylacetat und Chloroform) beschickt und das Eluat aufgefangen. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wird durch die Verwendung der Extraktionssäulen vereinfacht, da

keine Emulsionsbildung auftritt, Lösungsmittel sowie Zeit eingespart werden und das Eluat vor dem Einengen nicht mehr mit Na₂SO₄ getrocknet werden muß.

Für die Nitroxide mit Pyrrolidin-, Imidazolin- und Imidazolidinstruktur betrugen die Wiederfindungsraten bei Chloroformextraktion für **9** 94,3 % (s_% 2,3), für **11** 107,7 % (s_% 6,9), für **12** 92,3 % (s_% 3,5) und für **13** 46,7 % (s_% 17,9). Die geringe Wiederfindungsrate für **13** könnte auf die leichte Flüchtigkeit der Verbindung zurückzuführen sein (siehe Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften). Dafür spricht auch die im Vergleich zu den anderen Verbindungen mehr als doppelt so hohe relative Standardabweichung der Wiederfindungsrate nach der Extraktion.

3.3.2 Festphasenextraktion (SPE)

Seit einer Reihe von Jahren ist die Festphasenextraktion (SPE) eine etablierte Methode bei der Probenvorbereitung in der Bioanalytik. Es handelt sich hierbei um einen Extraktionsprozeß, der auf den im Vergleich zum Lösungsmittel der Probe stärkeren Wechselwirkungen des Analyten mit einer geeigneten Festphase beruht. Dabei weist die feste Phase eine stärkere Wechselwirkung mit dem Analyten als das Lösungsmittel auf, in dem die entsprechende Verbindung gelöst ist. Sobald die Probe das Sorbensmaterial (die SPE-Kartusche) durchläuft, reichert sich der Analyt an der Oberfläche der stationären Phase an, während die weniger wechselwirkenden Bestandteile und das Lösungsmittel ungehindert die stationäre Phase passieren. Anschließend kann der Analyt mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert werden. Bei dieser Extraktion treten neben reinen Verteilungsphänomenen auch weitere apolare und polare Wechselwirkungen wie "Van der Waals"-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol/ Dipol-, induzierte Dipol/ Dipol- und π - π -Wechselwirkungen in Erscheinung, die Auswahl selektiver stationärer Phasen bestimmt. Besonders vorteilhaft ist die gezielte Extraktion von interessierenden Bestandteilen aus komplexen Matrices und die Möglichkeit der Aufarbeitung großer Probenvolumina.

Für die durchgeführten Extraktionen wurden neben den etablierten RP-18 und RP-18 (encapped) Extraktionssäulen auch RP-8-, PH-, CN-, SCX-Säulen sowie Spezialsäulen (EN und Select B) eingesetzt. Die wesentlichen Parameter der verwendeten SPE-Kartuschen sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Verwendete SPE-Kartuschen, Sorbenseigenschaften und Elutionsmittel.

Kartusche	Funktionelle Gruppe	Unpolar	Polar	Ionenaustausch	Eluent
C-18	Octadecyl-	×	-	kein	org. LM
C-8	Octyl-	×	-	Kein	org. LM
PH	Phenyl-	×	°	Kein	org. LM
CH	Cyclohexyl-	×	°	Kein	org. LM
SCX	Propylbenzol-sulfonsäure	×	°	Kationen (sehr stark)	Puffer >0,1M
Spezialphasen EN; Select B	Octadecyl- (hohe Kapazität)	×	-	kein	org. LM

(× primäre Wechselwirkungen und ° sekundäre Wechselwirkungen nach [51])

In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der durchgeführten SPE-Untersuchungen dargestellt.

Tabelle 23: Ergebnisse der Versuche zur Festphasenextraktion von 3 Verbindungen (n= 3).

Kartusche	Extraktion (pH, Trockenzeit)	<u>1</u>	<u>1C</u>	<u>2</u>
Merck® C-18	pH 9,5; 10 s	63,3 %	18,9 %	15,2 %
Merck® C-18	pH 9,5; 30 s	54,5 %	19,7 %	17,4 %
Merck® C-18	pH 9,5; 60 s	51,0 %	21,3 %	17,4 %
Merck® C-18	pH 9,5; 90 s	39,7 %	19,2 %	15,7 %
Merck® C-18	pH 9,5; 120 s	42,1 %	19,9 %	17,2 %
Merck® C-18	pH 5,2; 60 s	59,4 %	3,4 %	14,9 %
Merck® C-18	pH 11,1; 60 s	29,5 %	10,4 %	15,8 %
Merck® C-8	pH 9,5; 60 s	32,0 %	11,4 %	38,7 %
Merck® Ph	pH 9,5; 60 s	32,3 %	8,9 %	11,3 %
Merck® CN	pH 9,5; 60 s	13,3 %	40,9 %	1,7 %
Merck® SCX	pH 5,2; 60 s	44,5 %	0 %	42,4 %
Merck® RP-select B	pH 9,5; 60 s	72,8 %-	93,1 %	43,6 %
Merck® EN	pH 9,5; 60 s	59,8 %-	85,7 %	62,0 %
Adsorbex® RP-18	pH 9,5; 60 s	54,9 %-	69,2 %-	32,5 %
OASIS® HLB	pH 9,5; 60 s	47,7 %-	67,1 %-	44,3 %

Nach Konditionierung, Extraktion und einem Waschschrift mit Pufferlösung wurde mit dem entsprechenden Elutionsmittel (z.B. Methanol bei RP-18) der Analyt von der stationären Phase eluiert. Die Ergebnisse waren hinsichtlich Wiederfindungsraten (< 70 %) und Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient 20- 36 %) für die Nitroxylradikale unbefriedigend. Die Verwendung anderer Chargen der Extraktionsäulen, Variationen des Extraktionsmittels (Methanol, Acetonitril, Chloroform, Chloroform-Isopropanol-Mischungen) sowie Veränderungen des Waschprozesses brachten keine entscheidenden Verbesserungen. Lediglich bei Verwendung von unpolaren Adsorbex® RP-18- Kartuschen sowie

Spezialphasen mit erhöhter Kapazität (Merck LiChrolut® EN) ergaben sich für das diamagnetische sekundäre Amin **1C** mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion vergleichbare Ergebnisse. Die unbefriedigenden Ergebnisse bei der Festphasenextraktion von Nitroxylradikalen, könnten auf das Vorhandensein von aktiven Oberflächen oder Übergangsmetallen in der stationären Phase (modifiziertes Kieselgel) zurückzuführen sein. Dafür sprechen auch die Extraktionsergebnisse des diamagnetischen Amins **1C**.

Aufgrund der zu geringen Wiederfindungsraten für die Nitroxylradikale sowie der ungenügenden Reproduzierbarkeit wurde die SPE im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht als Methode der Probenvorbereitung für die Stabilitäts-, Reaktivitäts- und Biotransformationsuntersuchungen von Nitroxylradikalen eingesetzt.

3.3.3 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Im Rahmen von Untersuchungen zur Optimierung der Probenvorbereitung wurden die Einsatzmöglichkeiten der Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraction - SPME) als neue Extraktionsmethode (erst seit wenigen Jahren kommerziell erhältlich) überprüft. Die Festphasenmikroextraktion (SPME) wurde von *Pawliszyn et al.* zur Extraktion organischer Komponenten aus wässrigen oder gasförmigen Phasen (Headspace-SPME) entwickelt [52, 53, 54, 55, 56]. Aufgrund der einfachen Handhabung, des lösungsmittelfreien Arbeitens, der geringen Extraktionsverluste der Methode und der hohen Reproduzierbarkeit hat diese neue Technik in kurzer Zeit viele Anwender im Bereich der Umweltanalytik, speziell bei Wasseruntersuchungen gefunden [57, 58, 59]. Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Arbeiten zur Anwendung der SPME bei der Probenvorbereitung mit biologischen Matrices, wie Urin- und Blutproben. Diese beziehen sich vor allem auf die Drogenanalytik [60]. Weiterhin wurde der mögliche Einsatz im Rahmen des Arzneipflanzen-Screenings überprüft [61].

Die SPME beruht auf der Verteilung des Analyten zwischen der wässrigen Probenphase und einer mit Polymeren beschichteten Quarzfaser, die auf eine modifizierte GC-Spritze aufgesetzt wird (siehe Abbildung 29) [62, 63, 64].

Die Anreicherung der Analyten in der Polymerphase erfolgt somit nicht vollständig, sondern nur bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten in der Probe und der auf der Faser absorbierten Stoffmenge. Gleiches gilt für die Desorption von der Faser, da die Desorptionsbedingungen reproduzierbar gestaltet werden können.

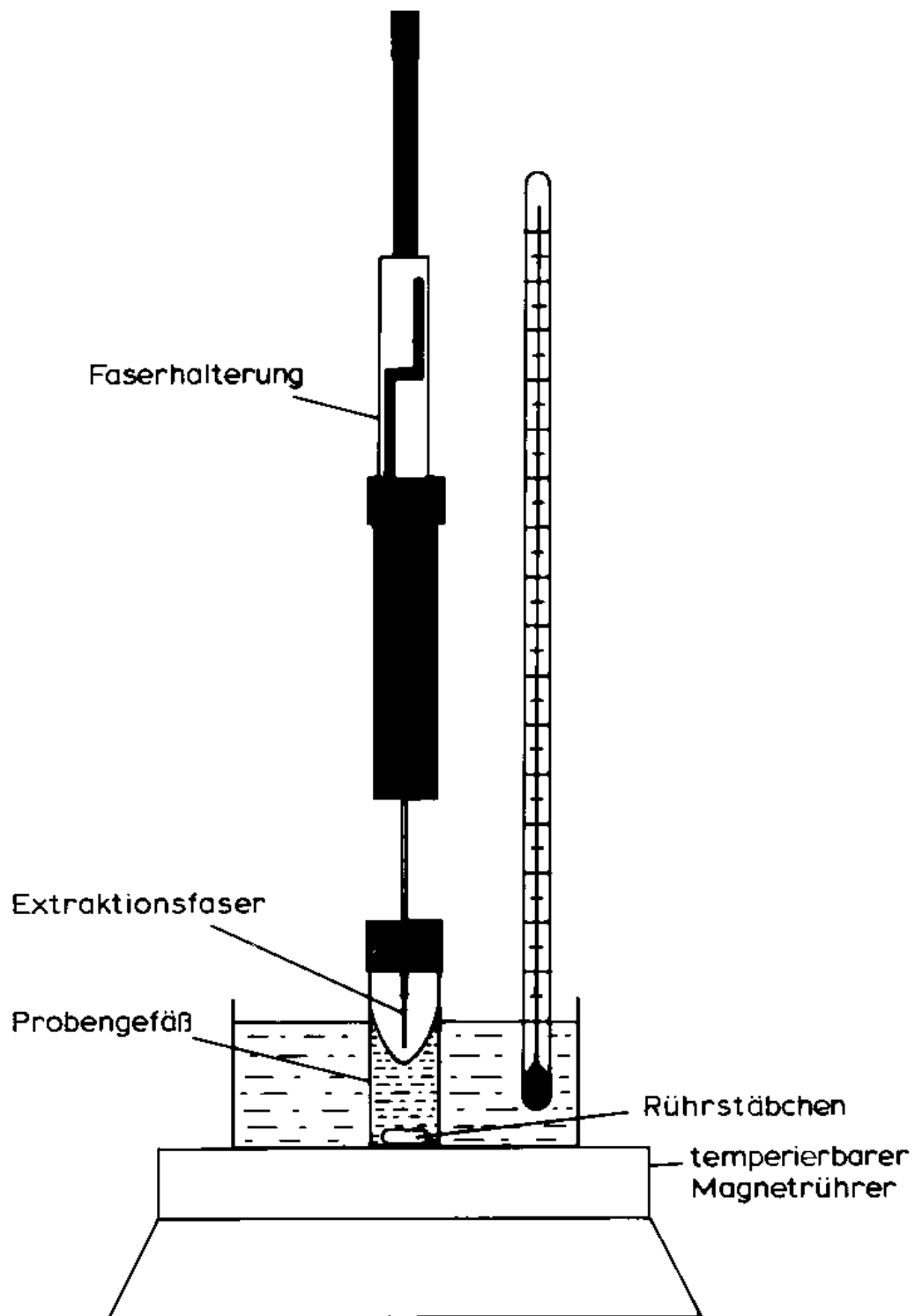


Abbildung 29: Schematischer Aufbau der eingesetzten Festphasenmikroextraktion(SPME)-Apparatur zur Headspace-Extraktion des Untersuchungsmaterials.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der direkten Festphasenmikroextraktion ist die Diffusion des Analyten in die Polymerschicht der Extraktionsfaser. Um die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten in der Grenzschicht Wasser/ Polymer zu verhindern, ist eine ständige Durchmischung notwendig. Nach dem Einbringen der Faser in den heißen Injektorblock des Gaschromatographen erfolgt eine thermische Desorption der Analyten. Die Extraktionsfaser ist anschließend sofort wiederverwendbar. Ein entscheidender Parameter ist demnach der Verteilungskoeffizient des Analyten zwischen wäßriger Probe und dem Polymerfilm als stationärer Phase. Als stationäre Phasen werden z.Z. hauptsächlich Polydimethylsiloxanbeschichtungen (PDMS) mit 100 µm und 7 µm Filmdicke zur Extraktion apolarer Substanzen und Polyacrylatbeschichtungen mit 85 µm Schichtdicke zur Erfassung von Verbindungen mit mittlerer Polarität angeboten. Das Verfahren zeichnet sich durch kurze Extraktionszeiten und eine sehr hohe mechanische Robustheit der Festphase aus. Damit wird z.B. in der Umweltanalytik unter Verwendung von tragbaren SPME-Apparaturen eine Extraktion direkt am Ort der Probennahme möglich [65].

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der SPME zur Extraktion des Piperidinnitroxides **1** und des sekundären Amins **1C** dargestellt. Als interner Standard wurde Thymol verwendet. Besonders auffällig ist dabei im GC das Fehlen eines Lösungsmittelpeaks bei Anwendung der SPME. Dabei sind leichtflüchtige Analyten auch noch bei relativ hohen Säulentemperaturen detektierbar, da sie nicht durch den intensiven Peak des Lösungsmittels überlagert werden.

In den Abbildungen 31- 36 sind die Ergebnisse der Optimierung^a der SPME als Methode zur Probenvorbereitung für ein Gemisch bestehend aus **1** und **1C** dargestellt. Dabei wurde der Einfluß von Expositionszeit der SPME-Faser in bzw. über der Probe, Extraktionstemperatur und Rührgeschwindigkeit, sowie Desorptionszeit und -temperatur im GC-Injektor auf die Peakflächen bei direkter SPME und bei Headspace-SPME untersucht. Es wurden bei jedem Versuch Fünffachbestimmungen durchgeführt.

Für die Untersuchungen zur Headspace SPME wurde eine apolare 7-µm-PDMS-Faser ausgewählt, während für die direkte SPME, bedingt durch den bei späterer Anwendung voraussichtlich hohen Anteil an Matrixkomponenten, die Verwendung einer 100-µm-PDMS-Faser günstiger erschien.

^a Bei der Optimierung wurden willkürlich diejenigen Extraktionsparameter ausgewählt, die in vertretbarer Analysenzeit zu den maximalen Peakflächen bei der Gaschromatographie führen. Mathematische Optimierungsfunktionen wurden im Rahmen dieser Arbeiten nicht erstellt.

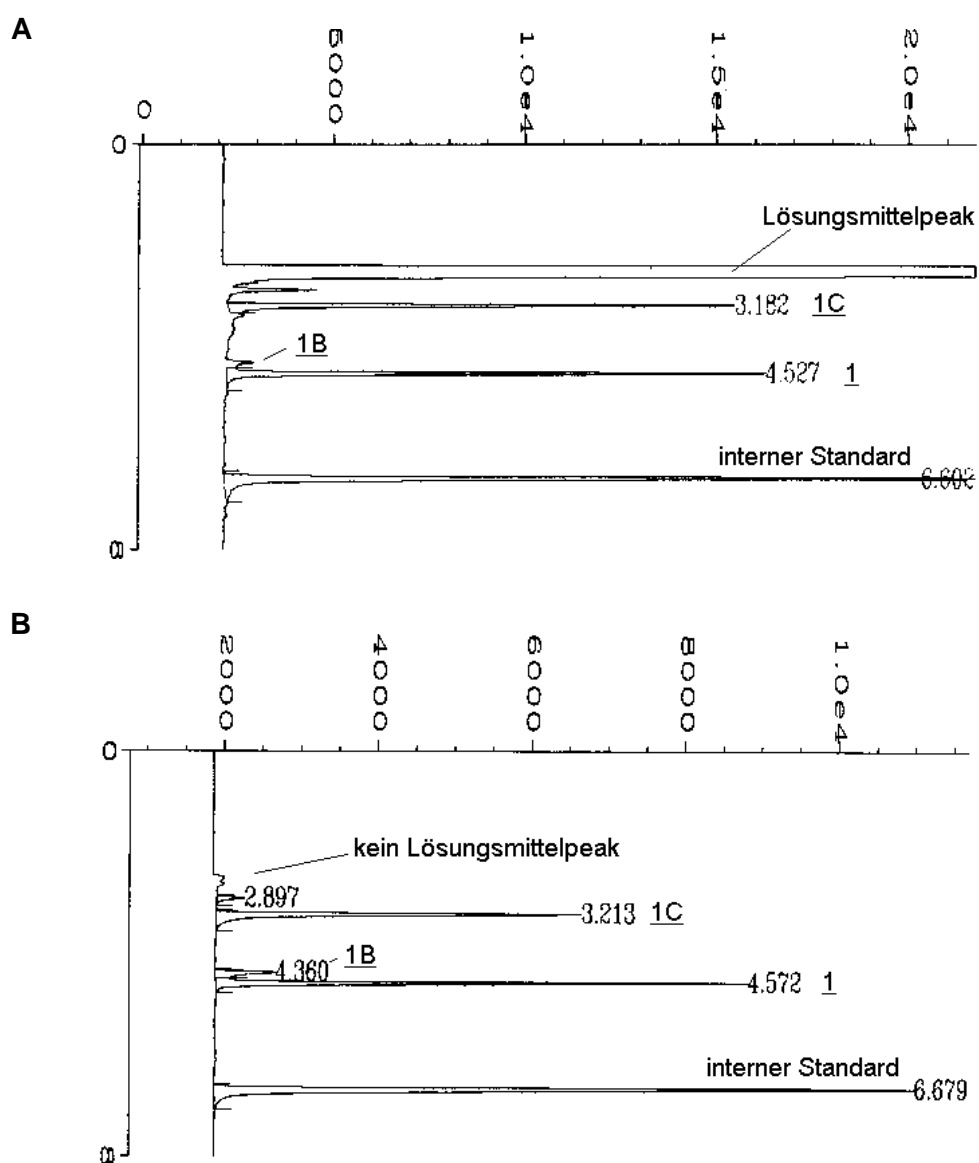


Abbildung 30: Gaschromatogramm (HP-5 Säule, 140°C) eines Gemisches von **1** ($t_R = 4,5$ min), dem sekundären Amin **1C** ($t_R = 3,2$ min) und dem internen Standard Thymol ($t_R = 6,6$ min) nach konventioneller Flüssig-Flüssig-Extraktion (A) und nach Headspace-SPME (B) als Methode der Probenvorbereitung.

Erste Arbeiten zum Desorptionsverhalten der absorbierten Analyten von der SPME-Faser zeigten, daß bei einer GC-Injektortemperatur von 250 °C und einer Expositionszeit von 1 min hier ein Optimum sowohl für die 7-µm-, als auch für die 100-µm-PDMS-Faser vorliegt. Diese beiden Parameter wurden bei den anschließenden Optimierungen konstant gehalten.

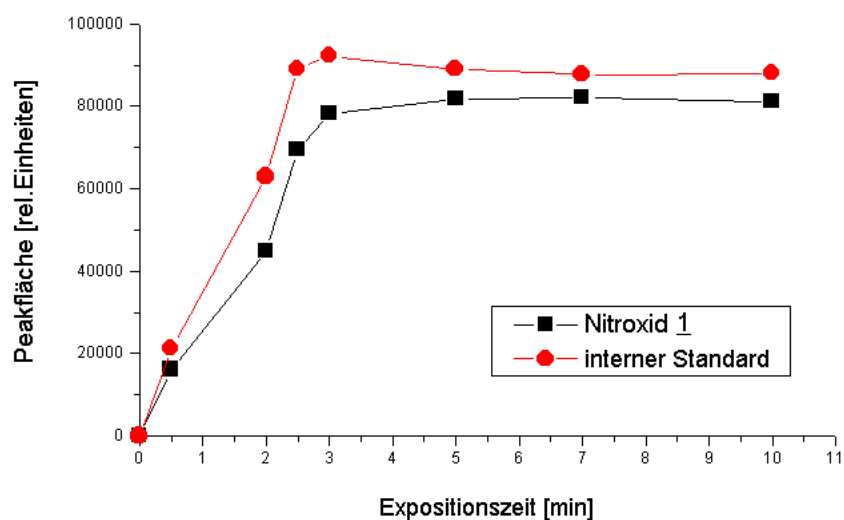


Abbildung 31: Abhängigkeit der Peakfläche von der Expositionszeit bei der direkten SPME (100- μ m-PDMS-Faser, Extraktionstemperatur 25°C, Rührgeschwindigkeit 400 U/ min).

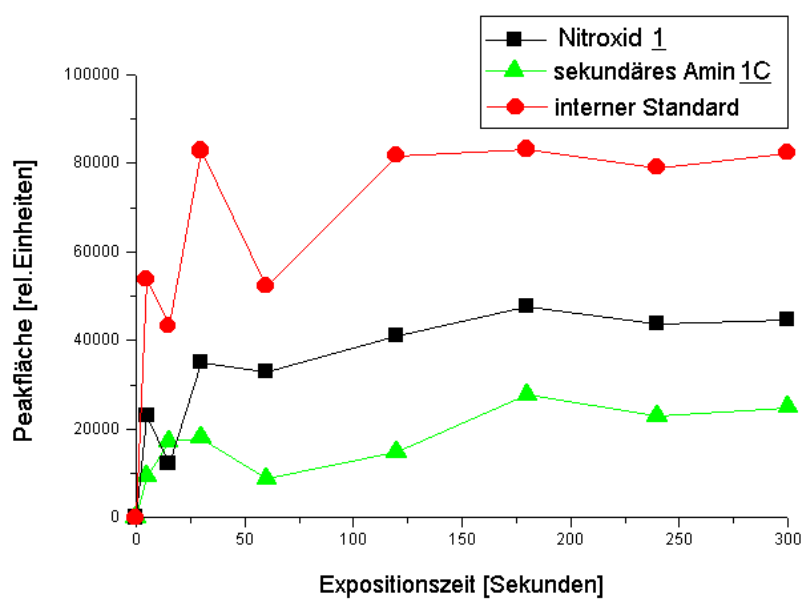


Abbildung 32: Abhängigkeit der Peakfläche von der Expositionszeit bei der Headspace-SPME (7- μ m-PDMS-Faser, Extraktionstemperatur 90°C, Rührgeschwindigkeit 900 U/ min).

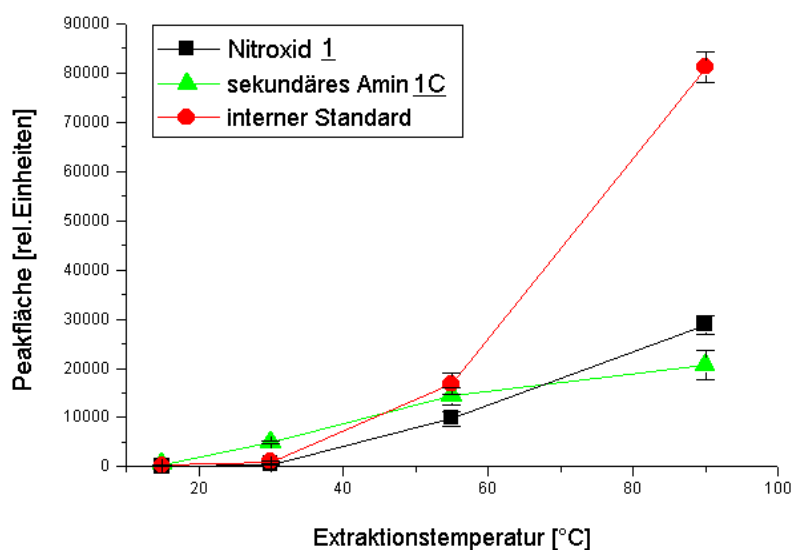


Abbildung 33: Abhängigkeit der Peakfläche von der Extraktionstemperatur bei der Headspace-SPME (7- μ m-PDMS-Faser, Extraktionstemperatur 90°C, Rührgeschwindigkeit 900 U/ min).

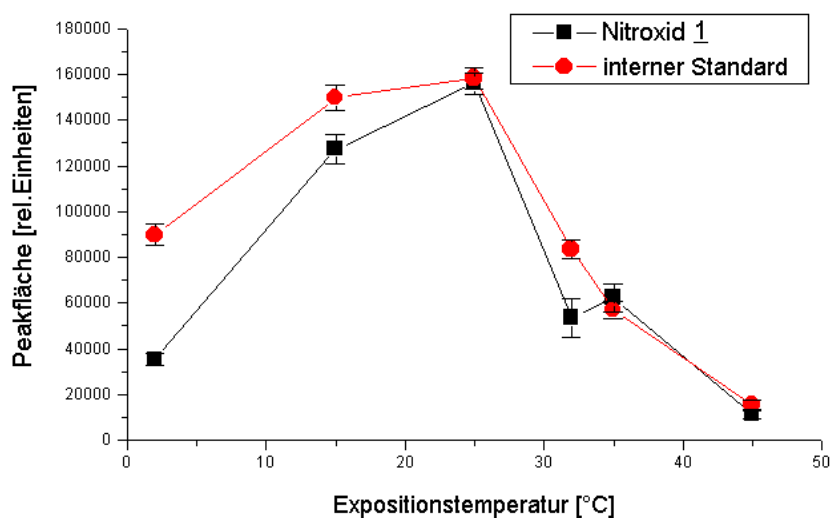


Abbildung 34: Abhängigkeit der Peakfläche von der Extraktionstemperatur bei der direkten SPME (100- μ m-PDMS-Faser, Extraktionstemperatur 25°C, Rührgeschwindigkeit 400 U/ min).

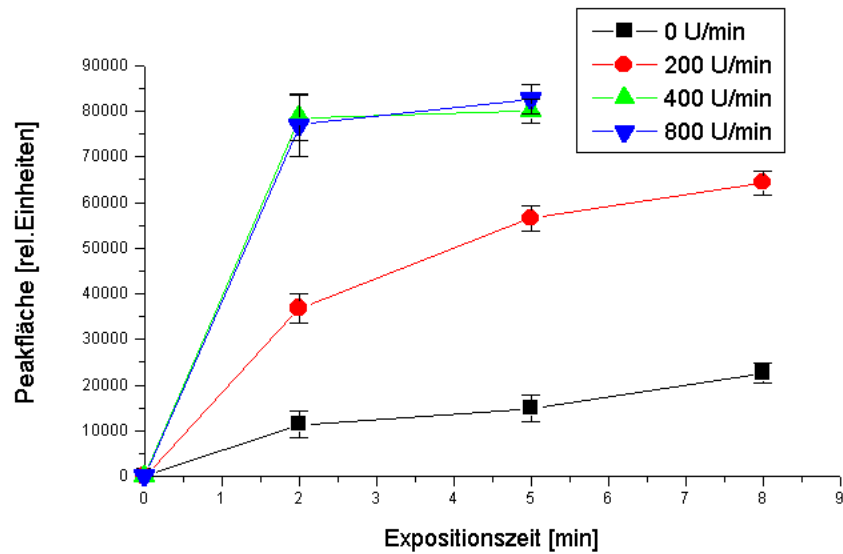


Abbildung 35: Abhängigkeit der Peakfläche von 1 von der Expositionszeit bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten bei der Headspace-SPME (7- μ m-PDMS-Faser, Extraktionstemperatur 90 °C).

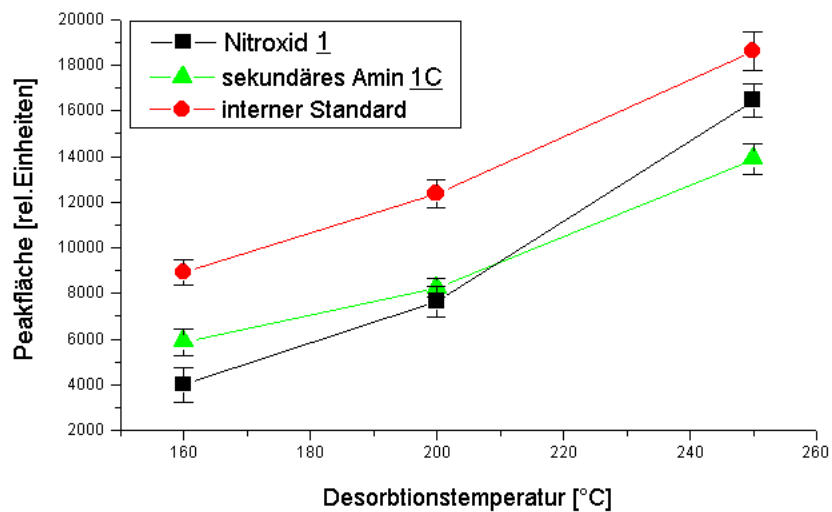


Abbildung 36: Einfluß der Desorptionstemperatur der SPME-Faser auf die Peakfläche bei der Headspace-SPME (7- μ m-PDMS-Faser; Extraktionstemperatur 90 °C; Rührgeschwindigkeit: 900 U/ min).

Die Untersuchungen zur optimalen Extraktionszeit zeigten (Abbildung 31 und 32), daß innerhalb von wenigen Minuten eine Gleichgewichtseinstellung zwischen der Faserbeschichtung und dem Probenraum (Untersuchungslösung bzw. Gasphase über der

Probe) erfolgt. In der Gasphase stellt sich das Verteilungsgleichgewicht aufgrund der wesentlich größeren Konvektion schneller ein, jedoch ergeben sich hier bei sehr kurzen Extraktionszeiten auch größere Abweichungen der Peakflächen. Erhöhungen der Extraktionstemperatur führten bei der Headspace-SPME zu zunehmenden Peakflächen, während das Temperaturoptimum der direkten SPME bei 25 °C liegt. Dies kann auf einen verstärkten Übertritt der Analyten in die Gasphase, bzw. eine erhöhte Desorption von der Faser während der Extraktion zurückgeführt werden.

Um bei der direkten SPME die Ausbildung einer Diffusionsschicht um die Faser, und damit längere Expositionszeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung zu vermeiden, wurde die Rührgeschwindigkeit des Magnetrührers variiert. Die stufenweise Erhöhung von 400- 900 U/min brachte keine Vergrößerung der angereicherten Probenmenge nach 5 min Expositionszeit. Bei der Headspace-SPME dagegen konnte eine deutliche Zunahme der Peakflächen mit wachsender Rührgeschwindigkeit festgestellt werden.

Aufgrund der durchgeführten Arbeiten zur Optimierung der SPME konnten die in Tabelle 24 dargestellten Extraktionsparameter erhalten werden.

Tabelle 24: Extraktionsparameter der Festphasenmikroextraktion (SPME) für die Piperidinverbindungen **1** und **1C**.

Parameter	Headspace SPME (7 µm PDMS-Faser)	Direkte SPME (100 µm PDMS-Faser)
Probenvolumen (ml)	3,0	3,0
Extraktionszeit (min)	5	5
Temperatur (°C)	90	25
Rührgeschwindigkeit (U/min)	900	400
Desorptionstemperatur (°C)	250	250
Desorptionszeit (min)	1	1

Die Verbindungen **1** und **1C** wurden mittels Thymol als interner Standard nach SPME und anschließender gaschromatographischer Auftrennung quantifiziert. Die Erstellung der Kalibrierfunktionen erfolgte unter Berücksichtigung der ausgewählten Extraktionsparameter. Die Linearität ist im gesamten Konzentrationsbereich (0.5- 1000 µg/ ml) gegeben. Das gilt sowohl für die direkte SPME, als auch für die Headspace-SPME. Abbildung 37 zeigt die Kalibrierfunktionen der Headspace-SPME. Der starke Anstieg der Flächen des internen Standards, ist dabei auf dessen leichte Flüchtigkeit zurückzuführen.

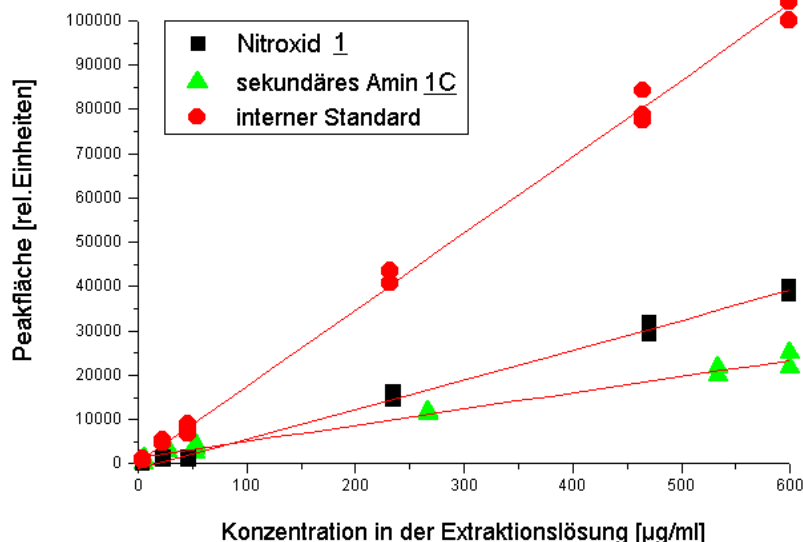


Abbildung 37: Kalibrierfunktionen für die Headspace-SPME unter Verwendung der optimierten Extraktionsparameter (7-µm-PDMS-Faser; Extraktionstemperatur 90 °C; Rührgeschwindigkeit: 900 U/ min).

Mit Hilfe der Headspace-Technik und unter Einsatz einer apolaren 7-µm-PDMS-Extraktionsfaser gelang es, die Verbindungen **1** und **1C** mit sehr hohen Wiederfindungsraten (98- 101 %) und guter Reproduzierbarkeit (VK 4- 7 %) zu erfassen. Die Präzision der Ergebnisse war nach Einsatz der direkten SPME mit einem bestimmten VK von 3 % etwas besser. Die direkte Festphasenmikroextraktion von **1** und **1C** aus gespickten biologischen Proben (z.B. Zellkulturen, subzelluläre Fraktionen) erbrachte dagegen wesentlich schlechtere Resultate (Wiederfindungsrate 60- 70%, VK 10- 16 %) als die Headspace-SPME. Dieser Unterschied kann auf Konkurrenzreaktionen durch absorbierte lipophile Matrixbestandteile, oder auf die Ausbildung einer Diffusionsbarriere durch adsorbierte Proteine zurückzuführen sein. Für die weiteren Untersuchungen von biologischen Proben wurde deshalb ausschließlich die Headspace-SPME eingesetzt.

Im direkten Vergleich mit klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktionsverfahren sowie den neueren Festphasenextraktionstechniken (SPE) liefert die Headspace-SPME hinsichtlich Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit sehr gute Ergebnisse. Als weitere wesentliche Vorteile der SPME sind außerdem die lösungsmittelfreie Extraktion, der geringere Arbeitsaufwand, die ca. 100- 150fache Wiederverwendungsoption der Polymerfaser, sowie die Möglichkeit einer vollständigen Automatisierung der Probenvorbereitung zu nennen.

3.4 Zusammenfassende Schlußfolgerungen

Die beschriebenen spektroskopischen und chromatographischen Methoden wurden im Hinblick auf ihre Anwendung zu Stabilitäts-, Reaktions- und Biotransformationsuntersuchungen von Nitroxylradikalen und potentiellen Reaktionsprodukten bzw. Metaboliten überprüft, teilweise neu erarbeitet und optimiert.

Als Methode zur Probenvorbereitung für die Aufkonzentrierung und Reinigung von Nitroxiden sind die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die SPME geeignet, wohingegen die SPE in den eigenen Untersuchungen wenig befriedigende Ergebnisse aufgrund der ungenügenden Reproduzierbarkeit liefert.

Von den getesteten analytischen Methoden erwiesen sich die GC (mit FI- und NP-Detektor), die GC-MS und die ESR als gut geeignet zur Erfassung und Identifizierung bekannter und neuer Metaboliten. Als Grundlage für die Identifizierung und Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten wurden die Massenspektren einer Reihe von Referenzverbindungen aufgenommen und einer ausführlichen Diskussion unterzogen. Zur Bearbeitung quantitativer Fragestellungen sind die GC (mit internem Standard) und die HPTLC (mit externem Standard) geeignet. Als problematisch ist aber die notwendige Probenvorbereitung anzusehen, da eine Reoxidation der gebildeten Hydroxylamine lediglich eingeschränkt, nicht aber völlig verhindert werden kann. Für die Arbeiten zur Reaktionskinetik der Reduktion zum diamagnetischen Hydroxylamin bzw. zur Reoxidation zum paramagnetischen Nitroxylradikal wurde vorzugsweise die ESR-Spektroskopie eingesetzt, da hierbei die unerwünschten Reoxidationen weitgehend vermieden werden. Als besonders geeignete Methode wurde die On-line HPLC-ESR-Kopplung in Zusammenarbeit mit der Firma Marnetttech GmbH entwickelt und etabliert. Diese Kopplung stellt einen entscheidenden Fortschritt bei der Kombination von ESR und chromatographischen Methoden dar, da hier eine Separierung verschiedener paramagnetischer Spezies mit einer der Standard-cw-ESR vergleichbaren analytischen Empfindlichkeit möglich ist. Damit lassen sich nun auch Probleme bearbeiten und aufklären, die allein mit der Standard-ESR nicht lösbar sind. Da das verwendete ESR-Spektrometer MS-100 allerdings nur sehr begrenzte Zeit zur Verfügung stand, konnte die fertige und optimierte HPLC-ESR-Kopplung nur in geringem Umfang für die bearbeiteten Fragestellungen eingesetzt werden.

Mit ergänzenden IR- und NMR-spektroskopischen Untersuchungen gelang darüber hinaus die Erfassung von bestimmten funktionellen Gruppen und die Absicherung der Strukturaufklärung von Zersetzungs- und Reaktionsprodukten sowie Metaboliten.

4 Untersuchungen zur Stabilität von Nitroxylradikalen

Die Untersuchungen zur Stabilität der Nitroxide und der potentiellen Metaboliten dienen primär dem Ziel, Informationen zu möglichen Zersetzungsreaktionen unter Versuchsbedingungen zu gewinnen, sowie die Bildung von Artefakten während der Probenvorbereitung abschätzen zu können. Diese Untersuchungen sind zur Abgrenzung zwischen echten Metaboliten und Zersetzungsprodukten notwendig. Weiterhin dienen die Untersuchungen zur Stabilität der Abschätzung von wesentlichen stabilitätsbeeinflussenden Faktoren wie Wärme, Wasser, Luftsauerstoff, Redoxsysteme, Licht, pH-Wert und die Wechselwirkung mit aktiven Oberflächen (Göber, B. [66]; Grimm, W. und Schepky, G. [67]).

Die bisher in der Literatur vorliegenden Ergebnisse zur Stabilität von Nitroxylradikale wurden ausschließlich mit Hilfe von ESR-spektroskopischen Untersuchungen erhalten [68]. Weitergehende Untersuchungen unter Einbeziehung anderer spektroskopischer und chromatographischer Methoden sowie der MS wurden nicht durchgeführt. Gebildete diamagnetische Zersetzungsprodukte konnten somit nicht erfaßt werden. Daher erschien es notwendig, weitere Methoden in die Untersuchungen zur Stabilität einzubeziehen.

Für die Bewertung der Stabilitätsuntersuchungen ist es wichtig zu berücksichtigen, daß alle Hydroxylamine (auch von kommerziellen Anbietern) stets mit Spuren der entsprechenden korrespondierenden Nitroxide kontaminiert und somit schwach ESR-aktiv sind.

Versuche zur Abtrennung der paramagnetischen Nitroxide mittels chromatographischer Verfahren ergeben dabei keine wesentlichen Verbesserungen der Reinheit, da sich die Reoxidation auch unter Schutzgasatmosphäre nicht vollständig unterbinden läßt.

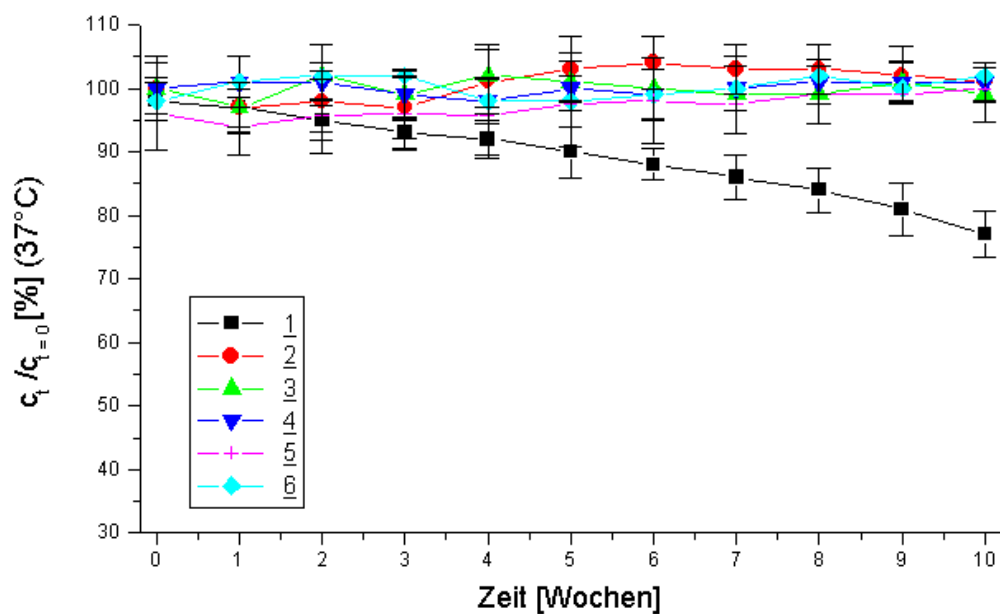
Die eingesetzten sekundären Amine besitzen eine durch chromatographische Verfahren nachgewiesene hohe Reinheit (> 99,9 %).

4.1 Stabilität in wäßriger Lösung

Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Nitroxide in isotonischem Phosphatpuffer pH= 7,4 gelöst und 10 Wochen bei einer mittleren Raumtemperatur von 25 °C sowie bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Zusätzlich zu diesen Arbeiten wurden die Lösungen vor Beginn der Lagerung mit Stickstoff gespült. Die Probennahme erfolgte jeweils wöchentlich. Die Proben wurden aufgearbeitet und mittels ESR-Spektroskopie, mit der quantitativen GC sowie mit HPTLC und anschließender densitometrischer Auswertung untersucht.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 38 und 39 graphisch dargestellt.

A



B

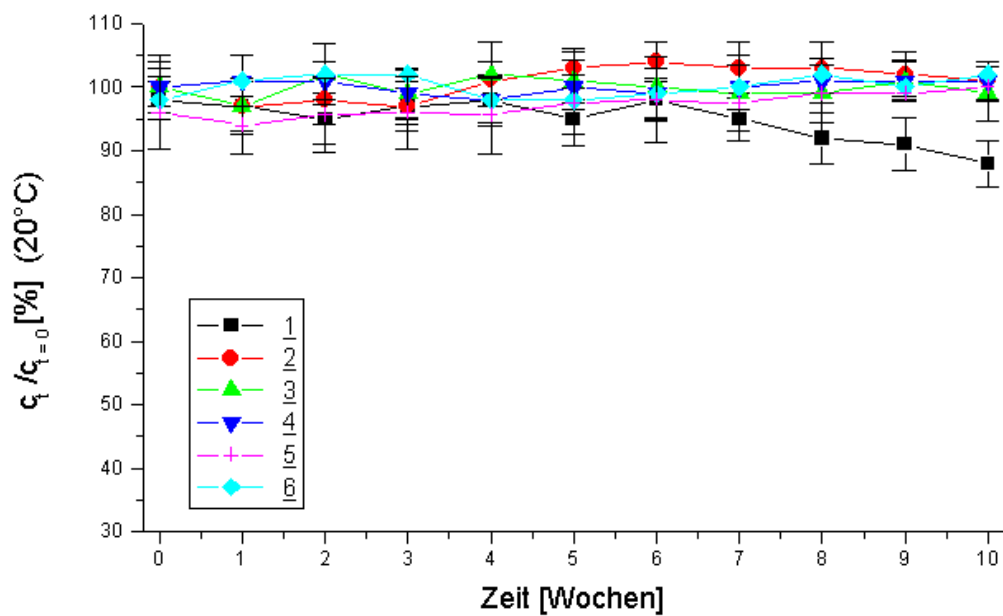
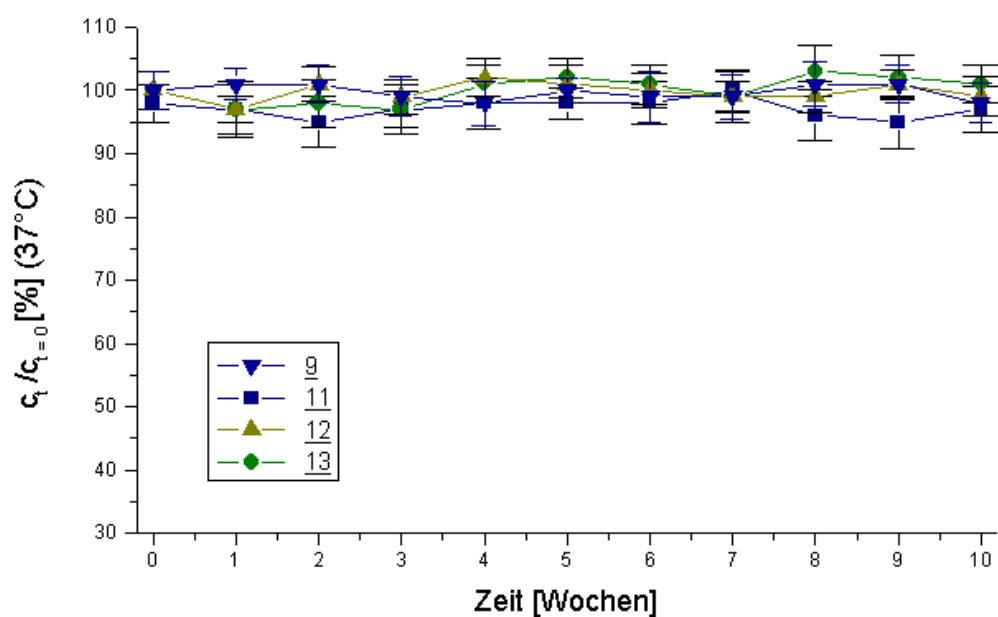


Abbildung 38: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen von Piperdinitroxiden; gelagert bei 37°C (A) und 20°C (B) über einen Untersuchungszeitraum von 10 Wochen (Konz.: 1 mmol·l⁻¹ in PBS-Puffer, lichtgeschützt gelagert).

A



B

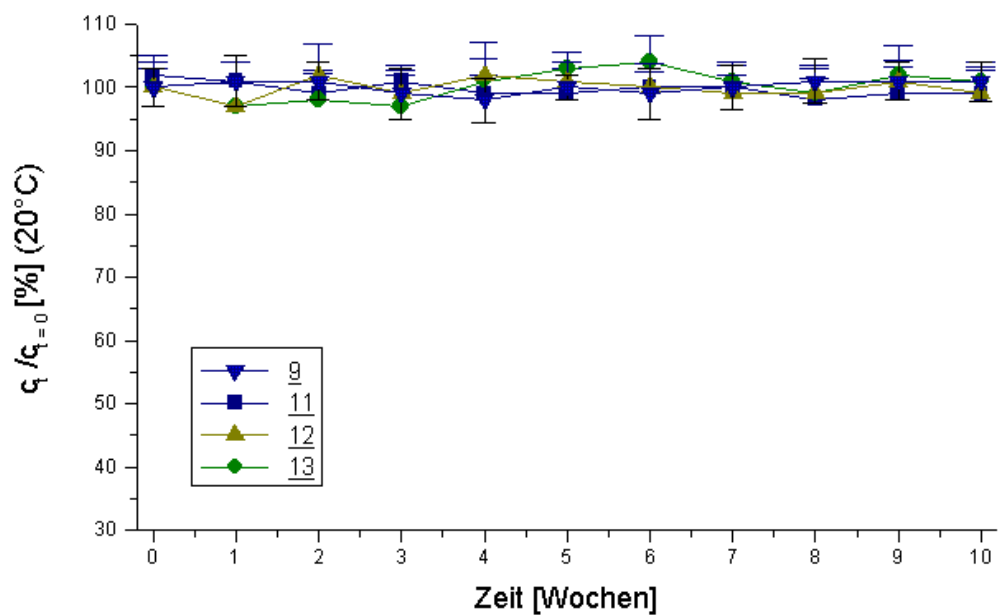


Abbildung 39: Stabilität der Pyrrolidin-, Imidazol- und Imidazolidinnitroxide bei 37°C (A) und 20°C (B) über einen Untersuchungszeitraum von 10 Wochen (Konz.: 1 mmol·l⁻¹ in PBS-Puffer, lichtgeschützt gelagert).

Für alle untersuchten Verbindungen, mit Ausnahme von Nitroxid **1**, wurde nach 10 Wochen keine signifikante Abnahme ($P \leq 0,01$) der Konzentration während der Lagerung bei 20 °C und 37 °C festgestellt. Sowohl die durchgeführten quantitativen HPTLC-Analysen, als auch die anschließenden GC-MS- und ESR-Untersuchungen ergaben in diesem Zeitraum keine Hinweise auf Zersetzungsprodukte. Das Ausmaß der Abnahme der Konzentration von **1** ist bei 37°C höher als bei 25°C, und dürfte auf die hohe Flüchtigkeit der Verbindung zurückzuführen sein. Eine hydrolytische Zersetzung des Esters **5** konnte auch nach 10 Wochen nicht beobachtet werden.

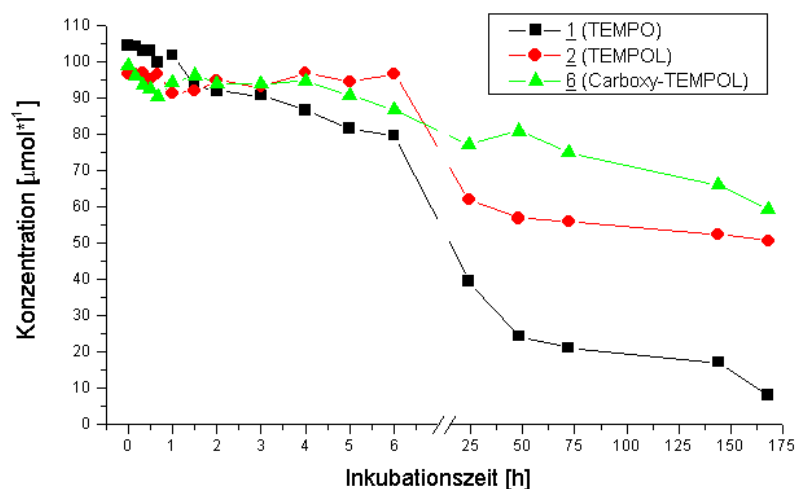
4.2 Stabilität im künstlichen Magen- und Darmsaft

Da stabile Nitroxylradikale auch als extravasal anzuwendende Kontrastmittel und potentielle Pharmaka per os von Interesse sind, wurden Untersuchungen zur Stabilität dieser Verbindungen im Magen- und Darmsaft durchgeführt. Da es sich bei diesen Flüssigkeiten um komplexe und in ihrer Zusammensetzung und pH-Wert sehr variable Lösungen handelt, hat sich die Verwendung von standardisierten künstlichen Magen-(Pepsin-Salzsäure-Lösung) und Darmsaft (Pankreatin-NaHCO₃-Lösung) im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen weitgehend durchgesetzt.

Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Substanzen sowohl im künstlichen Magensaft, als auch im künstlichen Darmsaft gelöst (100 µmol·l⁻¹) und bei 37 °C über einen Versuchszeitraum von einer Woche inkubiert. Die entnommenen Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung der Nitroxide erfolgte direkt über die ESR-Signalintensität der Nitroxide sowie mit Hilfe der quantitativen HPTLC nach vorhergehender Extraktion. Die Ergebnisse dieser Stabilitätsuntersuchungen sind für 3 Piperidinnitroxide in Abbildung 40 dargestellt.

Die untersuchten Piperidinnitroxide zeigen dabei eine ausgesprochene Instabilität im künstlichen Magensaft. Die Konzentration der Ausgangsverbindung nimmt relativ schnell ab und schon nach wenigen Minuten ist mittels ESR kein Nitroxid mehr detektierbar. Nach Alkalisierung der Lösung (pH 10) ist wieder ein ESR-Signal meßbar, allerdings mit verminderter Signalamplitude. Dieser Effekt ist durch den sehr niedrigen pH-Wert in der Lösung erklärbar. Die Nitroxylfunktion disproportioniert dabei im stark sauren Medium zum Hydroxylamin und zum korrespondierendem Oxammoniumkation. Durch Alkalisierung ist diese Disproportionierungsreaktion umkehrbar. Neben dieser Disproportionierung laufen aber weitere Reaktionen ab, die zu einer Zerstörung des Piperidinringsystems führen.

A



B

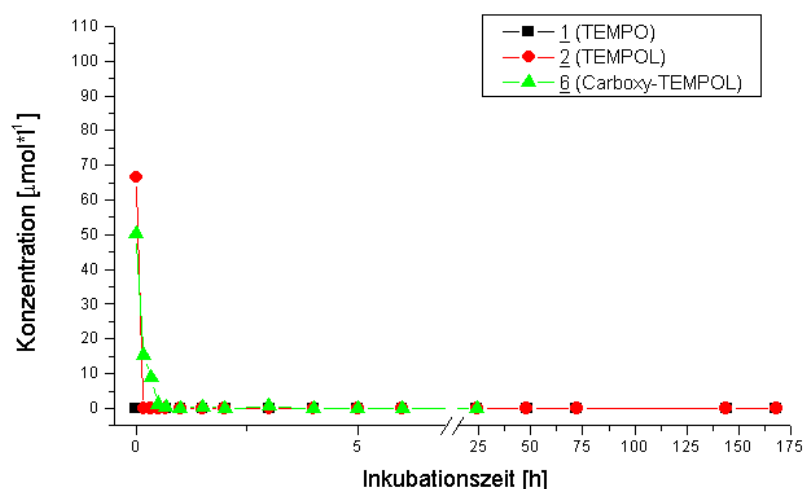


Abbildung 40: Stabilität der Piperidinnitroxide 1, 2 und 6 (Konzentration bei $t = 0$ h $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) im künstlichen Darm- (A; pH= 7,4) und künstlichen Magensaft (B; pH= 1,4) bei 37°C .

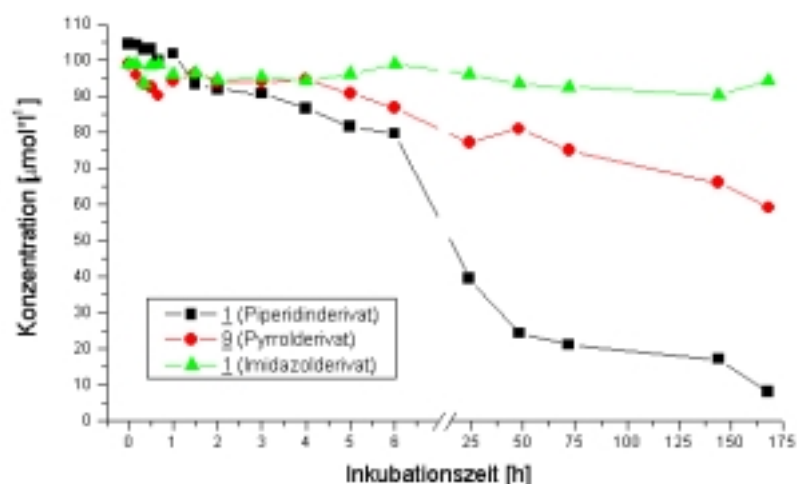
Im Verlauf der Inkubation von Nitroxiden mit künstlichen Darmsaft nimmt die Konzentration der Verbindungen meßbar ab. Zersetzungsprodukte mit Piperidinstruktur konnten nicht detektiert werden.

Besonders interessant ist der Einfluß von Substituenten in 4-Position des Piperidinsystems auf die Stabilität der Nitroxide. So bewirken die sowohl die Hydroxyl- (2), als auch die Carboxylfunktion (6) eine Verminderung des Nitroxylradikalabbaus im Darmsaft im Vergleich

zur unsubstituierten Verbindung 1. Die schwache Säure 6 zeigt dabei die höchste Stabilität.

Der Vergleich der Stabilität von Nitroxiden mit Piperidin-, Pyrrol- und Imidazolstruktur im künstlichen Magen- und Darmsaft ist in Abbildung 41 dargestellt. Innerhalb der Imidazolgruppe traten keine ausgeprägten Stabilitätsunterschiede auf.

A



B

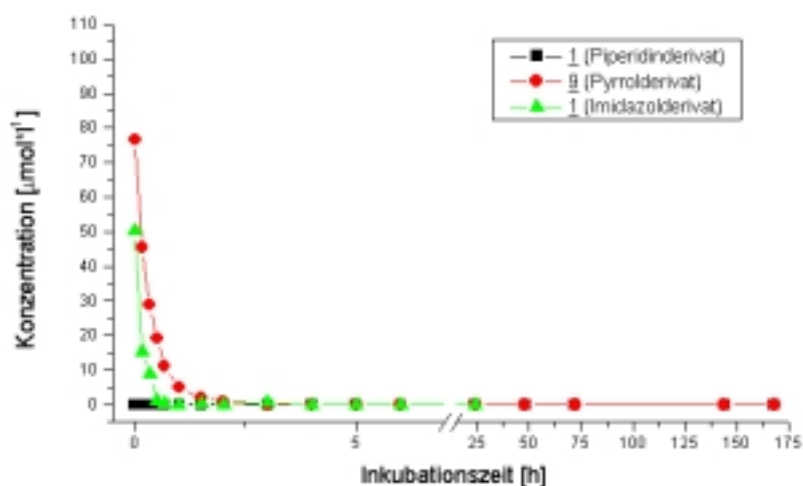


Abbildung 41: Vergleich der Stabilität von Piperidinnitroxid 1, Pyrrolnitroxid 9 und Imidazolnitroxid 11 (Konzentration bei $t = 0$ h $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) im künstlichen Darm- (A; pH= 7,4) und künstlichen Magensaft (B; pH= 1,4) bei 37 °C.

Die Fünfringe zeigen im Vergleich zu den Piperidinderivaten eine deutlich verbesserte Stabilität unter den Versuchsbedingungen. Allerdings treten auch zwischen den einzelnen Fünfringen Stabilitätsunterschiede auf, die neben den verschiedenen Substituenten in erster Linie auf die unterschiedlichen Ringsysteme der zurückzuführen sind.

Nitroxid **9** zeigt unter den Versuchsbedingungen den geringsten ESR-Signalverlust und damit die höchste Stabilität sowohl im basischen als auch im stark sauren pH-Bereich. Es ist somit am besten für die Anwendung per os geeignet. Dieser Stabilitätsbefund deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen zur Stabilität von Nitroxid **9** unter den Bedingungen der MS.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die perorale Applikation von Nitroxiden, speziell von Piperidinderivaten, im Rahmen von In-vivo-Versuchen aufgrund der beschriebenen Instabilitäten deutlich eingeschränkt. Der zukünftige Einsatz von Nitroxiden muß sich deshalb auf Verbindungen mit ausreichender Stabilität konzentrieren.

4.3 Stabilität unter Streßbedingungen

Die Untersuchungen zur Stabilität unter unphysiologischen Bedingungen dienten in erster Linie zur Überprüfung des Einflusses der Probenvorbereitung auf die Stabilität sowie der Abschätzung der Veränderung der Verbindungen über einen sehr langen Lagerungszeitraum. Diese isothermischen Kurzzeittests werden häufig durchgeführt, um sehr lange Lagerzeiten von vielen Monaten bis mehreren Jahren zu vermeiden. Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Nitroxide in Wasser, in 1 N Salzsäure sowie in 1 N Natronlauge gelöst ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) und einem isothermischen Kurzzeittest (1 h bei 80 °C) unterzogen. Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten $t = 0, 15, 30, 45$ und 60 min. Die Proben wurden direkt mittels ESR-Spektroskopie vermessen. Nach Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden die Extrakte mit der HPTLC und des GC-MS untersucht.

Als Ergebnis dieser Stabilitätstests konnte festgestellt werden, daß die Nitroxylradikale nach 1 h praktisch unverändert in Wasser und in 1 N Natronlauge vorliegen. Bei der chromatographischen Überprüfung der nach Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Extrakte konnten mit Ausnahme bei Nitroxid **5** keine Zersetzungsprodukte (ZP) nachgewiesen werden. Der Benzoessäureester **5** wird unter den Versuchsbedingungen zu Nitroxid **2** und Benzoessäure hydrolysiert. Während diese Hydrolyse in Wasser nur in sehr geringen Umfang abläuft, konnte in 1 N Natronlauge schon nach 15 min. bei 80 °C kein Ester mehr nachgewiesen werden.

Die Wiederfindungsraten nach 60 min. betrugen aber für alle untersuchten Nitroxide mit

Ausnahme der Carboxyverbindungen **6** (87 %) und **9** (89 %) sowie des Imidazolderivates **11** (94 %) nur 25- 60 %. Diese drei Verbindungen besitzen relative Schmelztemperaturen von > 160 °C. Möglicherweise geht während des Streßtestes bei den übrigen Verbindungen ein großer Anteil der eingesetzten Menge an Substanz, bedingt durch die hohe Flüchtigkeit der Verbindungen, trotz intensiver Rückflußkühlung verloren.

In 1 N Salzsäure erfolgt bei 80 °C innerhalb von kürzester Zeit (15 min) praktisch eine fast völlige Zerstörung der Nitroxide. Die ursprünglichen Nitroxide waren nur noch in geringen Mengen vorhanden. Es konnten kein Unterschiede zwischen den verschiedenen Nitroxiden mit Piperidin-, Pyrrol- und Imidazolstruktur festgestellt werden. Unter diesen drastischen Versuchsbedingungen konnte in den Extrakten jeweils eine Vielzahl an Peaks detektiert werden. Dies deutet auf eine intensive Zersetzung der Nitroxide unter diesen Bedingungen hin.

Das HPTLC-Chromatogramm und die entsprechenden Zersetzungsprodukte von Nitroxid **1** sind in Abbildung 42 und Tabelle 25 aufgeführt. Zur Gewinnung der Reinsubstanzen für die ESR und MS-Untersuchungen wurde eine präparative DC-Trennung durchgeführt.

Tabelle 25: Mittels HPTLC detektierte Zersetzungsprodukte von Piperidinnitroxid **1** nach Kurzzeitstabilitätstest (1 N Salzsäure; 80 °C; 1 h; Flüssig-Flüssig-Extraktion).

Peak	R _f -Werte ¹	λ _{max} ² (nm)	ESR-Signal	MS-Molekül- peak
1	0,08	236	Negativ	149
2	0,14	274	Positiv	153
3	0,31	272	Negativ	149
4	0,52	247	Positiv	156
5	0,77	278/ 224	Negativ	-
6	0,87	225	negativ	-

¹Laufmittel III mit Kammersättigung; ² Remissionsmessung auf Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC-Platte

Die eingesetzten Sprühreagenzien Dragendorffs Reagenz; Ehrlichs Reagenz; Ninhydrin-Reagenz; Formaldehyd-H₂SO₄-Reagenz zeigten keine Anfärbung der Zersetzungsprodukte. Entsprechende funktionelle Gruppen oder oxidierbare Strukturen sind somit nicht nachweisbar.

Die Abbildung 43 zeigt das Gaschromatogramm des Extraktes von Nitroxid **1**. Von den Zersetzungsprodukte wurden die entsprechenden Massenspektren mittels GC-MS aufgenommen (siehe Tabelle 26). Bedingt durch das Trennprinzip der GC können nur entsprechend leichtflüchtige Zersetzungsprodukte getrennt und detektiert werden.

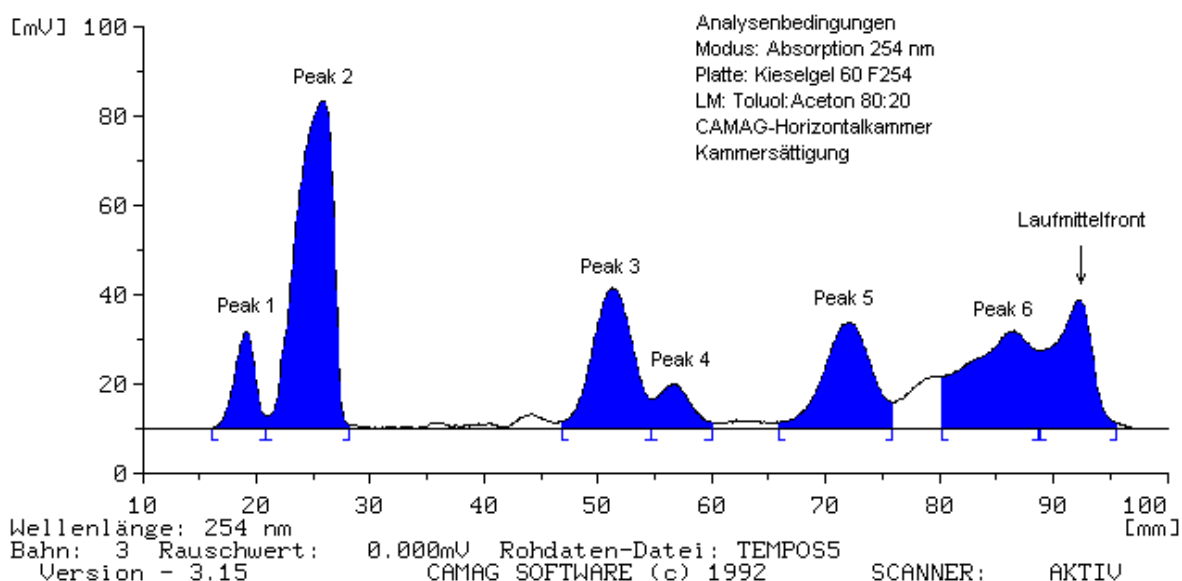


Abbildung 42: HPTLC-Chromatogramm des Extraktes von **1** (Flüssig-Flüssig-Extraktion) nach isothermischen Kurzzeittest in 1 N Salzsäure (1 h bei 80°C unter Rückfluß).

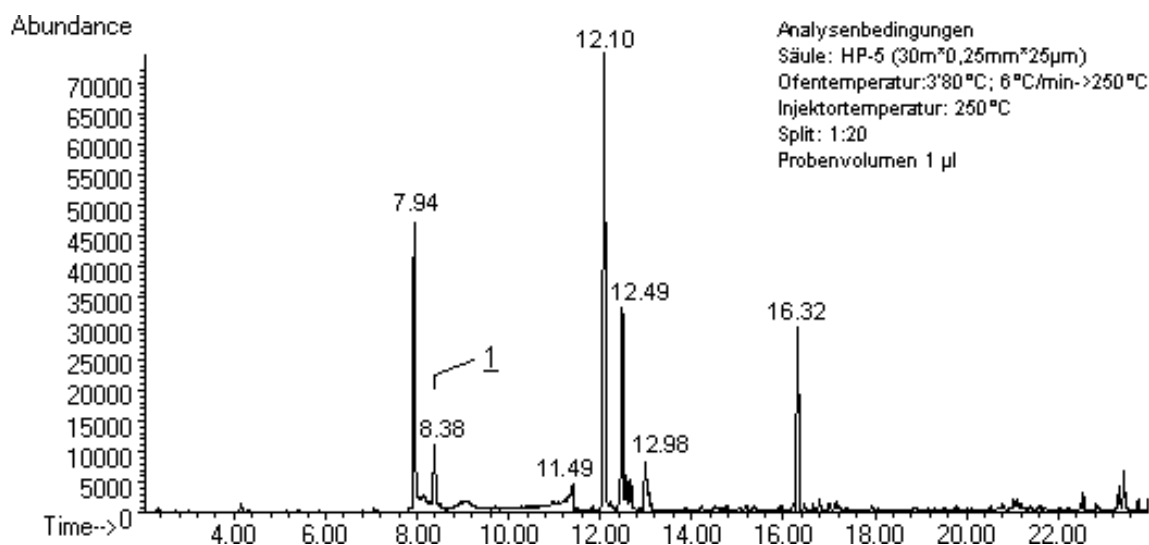


Abbildung 43: GC-Chromatogramm des Extraktes von **1** (Flüssig-Flüssig-Extraktion) nach isothermischen Kurzzeittest in 1 N Salzsäure (1 h bei 80°C unter Rückfluß). Von der Ausgangsverbindung **1** sind nur noch geringe Mengen nachweisbar ($t_R = 8,38$ min).

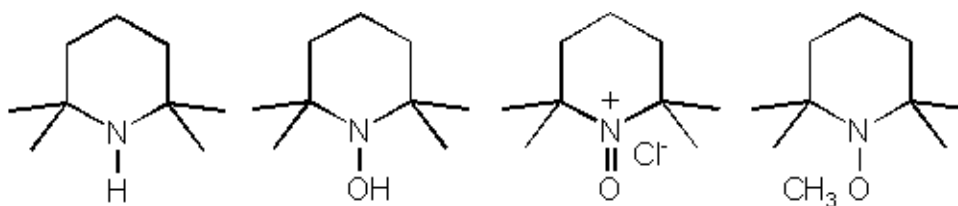
Tabelle 26: Mittels GC detektierte Zersetzungsprodukte von Piperidinnitroxid **1** nach isothermen Kurzzeitstabilitätstest (1 N Salzsäure; 80 °C; 1 h).

Peak.	t _R (min)	ausgewählte charakteristische MS-Fragmente (relative Intensität [%])	identifizierte Substanz
1	7,49	157(2); 156(9); 142(100); 126(7); 109(35); 86(15); 81(4); 74(30); 69(65); 56(51); 55(45); 41(47)	1B ¹
2	8,38	156(9); 141(11); 126(3); 109(2); 81(11); 74(15); 69(65); 57(15); 56 (76); 55(68); 43(17); 41(100)	1 ¹
3	11,49	142(2); 126(31); 112(4); 109(2); 71(69); 69(5); 56(55); 55(36); 42(19); 41(100)	1C •HCl ¹
4	12,10	154(2); 153(24); 152(16); 138(38); 122(2); 110(8); 96(5); 79(8); 69(17); 67(16); 55(26); 53(15); 42(24); 41(100)	unbekannt
5	12,49	168(3); 167(29); 156(2); 152(19); 138(2); 128(7); 111(8); 94(4); 84(10); 83(91); 69(14); 56(43); 55(54); 53(78); 43(36); 41(100)	unbekannt
6	12,98	171(1); 157(1); 156(7); 138(2); 128(29); 112(3); 96(7); 95(8); 85(6); 69(33); 59(17); 55(20); 43(100); 42(19) ; 41(64)	Methyladdukt von 1
7	16,32	2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	Artefakt ² (Weichmacher)

¹ zusätzliche Absicherung der Struktur durch Cochromatographie mit Referenzsubstanzen und IR- und NMR-Spektroskopie

Als Ergebnis der MS-Untersuchungen wurden die korrespondierenden Hydroxylamine, die sekundären Amine und die Oxammoniumverbindungen detektiert.

Die nachgewiesenen Zersetzungsprodukte von Nitroxid **1** sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Struktur von zwei weiteren Produkten konnte mittels HPTLC, GC-MS und NMR nicht eindeutig aufgeklärt werden.


Abbildung 44: Strukturformeln der vier aufgeklärten Zersetzungsprodukte von Nitroxid **1**.

Aus den Ergebnissen der durchgeführten isothermischen Kurzzeittests in neutralem und basischem Milieu läßt sich schließen, daß die untersuchten Verbindungen auch über einen längeren Zeitraum von mehreren Monaten ausreichend stabil sind (max. 10 %ige Abnahme). Bei der Probenvorbereitung und Isolierung der meisten Nitroxide muß aber deren relativ

leichte Flüchtigkeit berücksichtigt werden.

Unter stark sauren Bedingungen zeigen dagegen alle untersuchten Nitroxide nur geringe Stabilität. Neben einer reversiblen Disproportionierung, die zu Hydroxylaminen und Oxammoniumkationen führt, treten auch irreversible Zersetzungsreaktionen auf.

4.4 Stabilität gegenüber ionisierender Strahlung

Der Einsatz von Nitroxylradikalen zum Abfangen von radikalischen Intermediaten ist in der organischen Synthesechemie seit vielen Jahren etabliert [69]. Neue Einsatzgebiete ergeben sich bei Controlled-release-Untersuchungen im Rahmen der pharmazeutisch-technologischen Entwicklung und Optimierung von biologisch-abbaubaren Polymeren [70]. Hierzu werden Nitroxide in das Polymer inkorporiert und als Reportermolekül genutzt. Anhand der gemessenen ESR-Spektren können so auf nichtinvasivem Weg Informationen zur Mikropolarität, Mikroviskosität und zum pH-Wert im Trägersystem gewonnen werden. Fragestellungen zur Wasserpenetration in die Trägermatrix sowie zum Liberationsverhalten der Sonde können ebenfalls in situ untersucht werden [71].

Diese Untersuchungen sind auch nach Implantation dieser Trägermaterialien, z.B. unter die Haut von Versuchstieren oder Probanden, möglich. Da die Polymere, bedingt durch ihren chemischen Aufbau, nur durch ionisierende Strahlung sterilisiert werden können, ist die Untersuchung der Stabilität von Nitroxiden unter diesen Bedingungen Voraussetzung für ihren Einsatz. Aus diesem Grund wurde die Stabilität gegenüber ionisierender Strahlung eines für diesen Zweck bereits verwendeten Piperidinnitroxides untersucht.

Das Nitroxid **2** (TEMPOL) wurde in eine Glasampulle eingefüllt, zweimal intensiv mit Stickstoff gespült, und anschließend wurde die Ampulle unter Vakuum verschlossen. Die γ -Bestrahlung (26,8 und 54,9 kGy) erfolgte mittels ^{60}Co - γ -Quelle (Rüsch AG, Deutschland) bei -80°C unter Verwendung von Trockeneis. Anschließend wurde das Nitroxid **2** (gelöst in Methanol) mittels ESR-Spektroskopie und GC-MS untersucht.

Aus den erhaltenen GC-, ESR- und MS-Befunden kann abgeleitet werden, daß das untersuchte Nitroxid **2** unter den Bedingungen der Sterilisation mit γ -Strahlen stabil bleibt. Die Wiederfindungsrate der Ausgangsverbindung betrug annähernd 100 %. Das bedeutet, daß eine Strahlensterilisation von Arzneiträgersystemen, welche Nitroxylradikale enthalten, ohne Zerstörung der Spinsonden möglich ist.

4.5 Stabilität von Reaktionsprodukten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Stabilität von gebildeten Reaktionsprodukten

wie Hydroxylaminen und sekundären Aminen überprüft. So sind z.B. Untersuchungen zur Stabilität der korrespondierenden Hydroxylamine von Nitroxylradikalen von besonderer Bedeutung, da diese Verbindungen bekanntermaßen sehr instabil sind und eine Reoxidation zu Nitroxiden während der Probenaufarbeitung schon länger bekannt ist [4]. Systematische Untersuchungen zum Ausmaß der Reoxidation und zum Einfluß von Luftsauerstoff liegen bisher in der Literatur nicht vor. Für Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der Reaktions- und Biotransformationsuntersuchungen von Nitroxylradikalen ist die Stabilität der gebildeten Reaktionsprodukte von besonderem Interesse.

Im folgendem wurde deshalb die Stabilität der Hydroxylamine **1B** und **2B** sowie der sekundären Amine **1C**, **2C** und **4C** unter verschiedenen Sauerstoff-/ Stickstoffatmosphären untersucht.

Dabei kann besonders die Synthese und die Herstellung reiner Hydroxylamine Schwierigkeiten bereiten, da nach Reduktion der Nitroxide meist sehr schnell eine Reoxidation zum Radikal einsetzt. Die Kontamination mit den korrespondierenden Nitroxiden betrug bei **1B** 0,05 % und bei **2B** 2,7 %. Die untersuchten sekundären Amine enthalten keine nachweisbaren Mengen an Hydroxylaminen und Nitroxylradikalen.

Die untersuchten Verbindungen wurden in Phosphatpuffer pH = 7,4 (mit Stickstoff gespült) gelöst und die Lösung in gaspermeable TPX-Schläuche (Zeus Ind.) übergeführt. Anschließend wurde die Oxidation zum paramagnetischen Nitroxid mit Hilfe der ESR-Spektroskopie verfolgt. Die Reaktionstemperatur betrug konstant 37 °C und die Zusammensetzung der Gasphase wurde in bestimmten Zeitintervallen verändert.

Abbildung 45 zeigt die Reoxidation von Hydroxylamin **1B** zum Nitroxylradikal **1** gemessen als ESR-Signalintensität. Die Abhängigkeit der Reoxidation von Hydroxylaminen zu den korrespondierenden Nitroxylradikalen von der Sauerstoffkonzentration veranschaulicht die Abbildung 46.

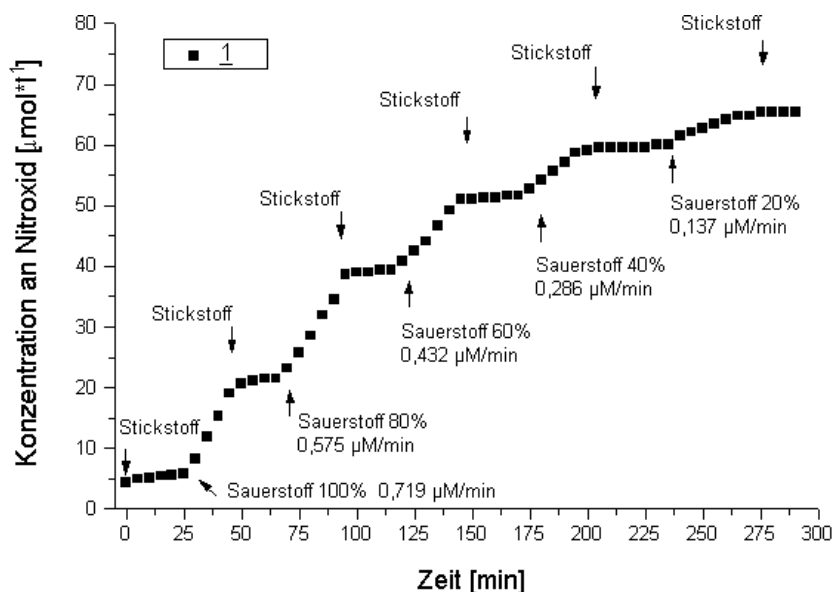


Abbildung 45: Reoxidation von Hydroxylamin **1B** zum korrespondierenden Nitroxylradikal **1** in Phosphatpuffer pH = 7,4 bei 37 °C (gemessen als ESR-Signalamplitude).

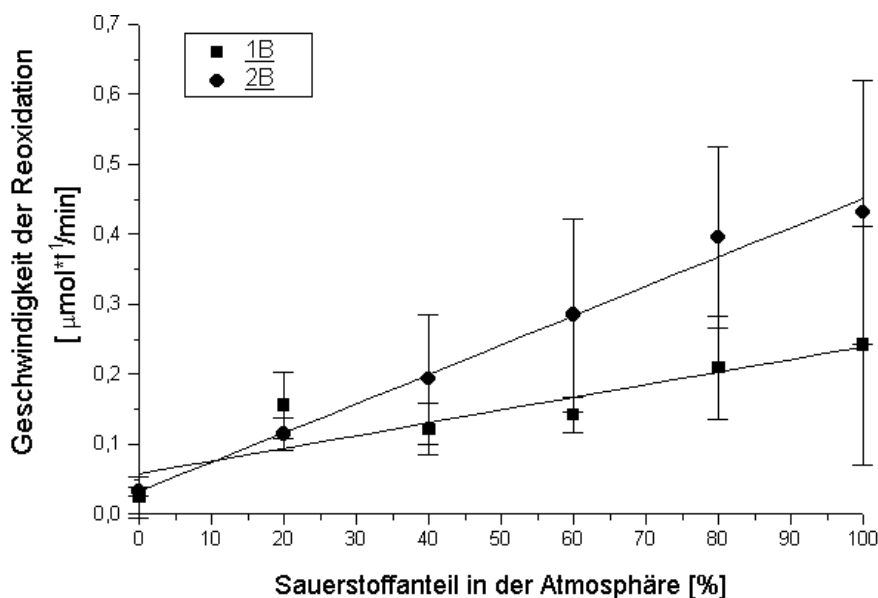


Abbildung 46: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reoxidation der Hydroxylamine **1B** und **2B** zu den korrespondierenden Nitroxylradikalen **1** und **2** vom Sauerstoff-/ Stickstoff-Verhältnis der umgebenden Atmosphäre. Als Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Änderung der Konzentration der Nitroxide pro Zeit verwendet.

Als Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen zur Reoxidation der eingesetzten Hydroxylamine läßt sich zusammenfassen, daß die Geschwindigkeit der Reaktion nahezu linear (siehe Abbildung 46) von der aktuellen Sauerstoffkonzentration abhängt. Bei der Probenvorbereitung und der Isolierung von Hydroxylaminen ist somit, auf möglichst vollständigen Ausschluß von Sauerstoff zu achten. Bei der Untersuchung der sekundären Amine **1C**, **2C** und **4C** konnte in keinem Fall eine nachweisbare Reoxidation oder sonstige Zersetzung festgestellt werden. Auch nach zehnwöchiger Lagerung in Pufferlösung ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; 37°C ; 20 %-Sauerstoffatmosphäre) wurden keine Zersetzungsprodukte nachgewiesen. Eine Autoxidation im biologischen Systemen oder eine Oxidation unter den Bedingungen der Probenvorbereitung ist somit ausgeschlossen.

4.6 Schlußfolgerungen

Die untersuchten Nitroxide sind in wäßriger Lösung und während der Probenvorbereitung unter schonenden Temperaturbedingungen (25°C) stabil, so daß eine Verfälschung der Ergebnisse durch derartige Artefakte ausgeschlossen werden kann. Die korrespondierenden Hydroxylamine sind dagegen sehr instabil und werden unter Einfluß von Luftsauerstoff sowie in Anwesenheit von Übergangsmetall-Ionen leicht zu den entsprechenden Nitroxylradikalen reoxidiert [3]. Die quantitative Erfassung der Hydroxylamine gestaltete sich somit äußerst schwierig, da selbst in Inertgasatmosphäre (Stickstoff) während der Versuche und bei der Probenvorbereitung eine leichte Reoxidation festgestellt wurde. Aus diesem Grund wurde bei den Biotransformationsuntersuchungen zuerst das verbleibende Nitroxid mittels ESR-Spektroskopie quantifiziert, anschließend das korrespondierende Hydroxylamin mit Kaliumhexacyanoferrat(III) weitgehend reoxidiert und die Gesamtkonzentration an Nitroxylradikal erfaßt. Der Anteil des gebildeten Hydroxylamins ergab sich somit aus der Differenz dieser beiden Nitroxylradikal-Bestimmungen. Die sekundären Amine erwiesen sich als sehr stabil. Die quantitative analytische Erfassung der Amine ist unproblematisch.

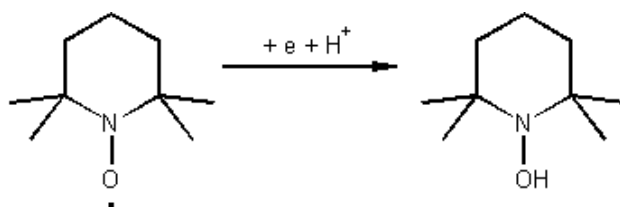
5 Untersuchungen zum chemischen und elektrochemischen Reduktionsverhalten von Nitroxylradikalen

5.1 Grundlegende Reaktionsmechanismen von Nitroxylradikalen

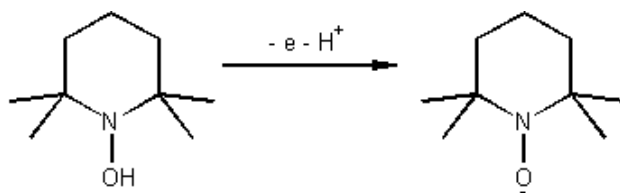
Die untersuchten Nitroxide zeigen als Moleküle mit einem ungepaarten Elektron ein ausgeprägtes Redoxverhalten. Sie können sowohl als Elektronenakzeptoren, als auch als Elektronendonatoren fungieren und reagieren mit einer Vielzahl von verschiedenen Reaktionspartnern.

Die wichtigsten Reaktionstypen sind im folgendem aufgeführt:

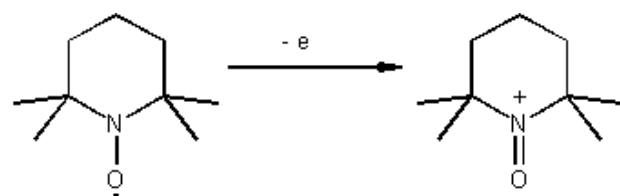
Reduktion



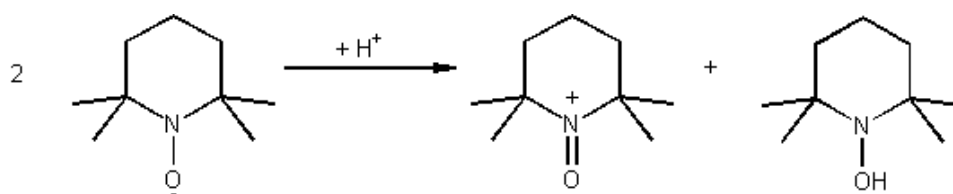
Reoxidation



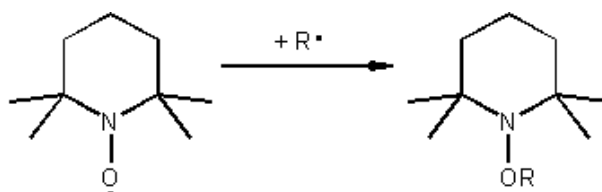
Oxidation



Disproportionierung



Reaktion mit Radikalen



Es erfolgt ausschließlich eine Reaktion mit anderen Radikalen (z.B. Alkylradikalen), da eine Dimerisierung der Nitroxide zu Peroxiden (Rekombination) unter physiologischen Bedingungen zwar nicht völlig auszuschließen ist [72], bisher aber nur bei Temperaturen von - 100 °C (und tiefer) in der Literatur beschrieben wurden [73].

Die Reduktion zum diamagnetischen Hydroxylamin ist von besonderer Bedeutung, da diese Reaktion nach bisherigen Erkenntnissen den Hauptweg der Biotransformation von Nitroxiden darstellt. Da sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede im Metabolismus auftreten, ist der Einfluß von Substituenten auf das Reaktionsverhalten der jeweiligen Nitroxide von besonderem Interesse.

Es gibt in der Literatur nur wenige Arbeiten, die sich mit dieser Problematik beschäftigten. So wurde z.B. der Einfluß von verschiedenen Substituenten, speziell bei phenylsubstituierten Radikalen der PBN-Gruppe, auf die ESR-Hyperfeinaufspaltung der Nitroxylfunktion untersucht [74]. Da die Größe der Hyperfeinaufspaltung ein Ausdruck der Elektronendichte am Kern ist, gab es eine Reihe von Versuchen, diese mit den Hammett'schen Sigma Konstanten der entsprechenden Substituenten [75] zu korrelieren, wobei diese Versuche aber nur partiell erfolgreich waren [76].

Neben der Stickstoffaufspaltung a_N ist besonders der Einfluß von Substituenten auf das Redoxpotential der Nitroxylfunktion für den medizinisch-biologisch orientierten Einsatz dieser Verbindungen von Interesse. Hierzu wurden von einigen Arbeitsgruppen sowohl Reaktionen mit Modellreduktionsmitteln (z.B. Ascorbinsäure), als auch elektrochemische Untersuchungen mit Hilfe der Cyclovoltammetrie [77, 78] sowie der klassischen

Polarographie durchgeführt [79]. Dabei ergaben sich erste Hinweise über Korrelationen zwischen chemischem und elektrochemischem Reduktionsverhalten und dem Einfluß von Ringstruktur und Substituenten. Allerdings wurde der Einfluß des pH-Wertes nicht in allen Fällen streng berücksichtigt. Der Vergleich von elektrochemischen Daten, die unter unterschiedlichen Bedingungen und mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden, ist als problematisch zu bewerten.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde das elektrochemische Reduktionsverhalten der Nitroxide in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösung mit Hilfe der Differentiellen Puls Polarographie (DPP) untersucht. Die DPP gestattet, als eine moderne elektrochemische Methode auch die Erfassung von Peakpotentialen in niedrigen Konzentrationsbereichen ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), die denen der biologischen Anwendung entsprechen. Als weiterer wesentlicher Vorteil kann damit auch auf den Zusatz von organischen Lösungsmitteln (z.B. DMF) zur Löslichkeitsverbesserung verzichtet werden.

Ziel der eigenen Arbeiten war es, Aussagen zum Einfluß von Substituenten zu erhalten und die Ergebnisse der elektrochemischen Reduktion mit denen der chemischen Reduktion der Nitroxylfunktion zu vergleichen. Dabei sollte überprüft werden, inwieweit aus diesen Ergebnissen Aussagen zur chemischen und biochemischen Stabilität der Nitroxide abgeleitet werden können.

5.2 Elektrochemisches Reduktionsverhalten

Mit Hilfe der DPP wurde der Einfluß von pH-Wert und elektronenziehenden Substituenten am Ringsystem auf die Peakpotentiale E_P (E_P steht zum Halbstufenpotential $E_{1/2}$ der klassischen Polarographie in folgender Beziehung: $E_P = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2}$, Henze *et al.* [80]) der

Nitroxide und somit auf das Reduktionsverhalten der Verbindungen untersucht. Vor Beginn der Versuchsreihe war aus der Literatur bekannt, daß eine pH-Abhängigkeit bei $\text{pH} > 7$ auftritt und die $E_{1/2}$ in negativere Bereiche verschoben werden (Peakpotentiale $E_{1/2} = 0,1$ zu $-0,3$ von $\text{pH} 1-13$ [81]). Die Reduktion der Nitroxylfunktion ist somit im alkalischen Bereich erschwert [82]. Bei pH-Werten < 7 besteht nach den zitierten Literaturangaben dagegen keine direkter Zusammenhang zum Reaktionsverhalten.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Britton-Robinson-Puffer nach tabellierten Werten hergestellt [83] und mit $0,1 \text{ N NaOH}$ auf einen definierten pH-Wert eingestellt. Anschließend wurden die pH-Werte durch Messungen mit der Wasserstoffelektrode überprüft. Um den Anforderungen der GLP nachzukommen, wurde die Richtigkeit der Wasserstoffelektrode unter Verwendung von Standardpuffern überprüft.

Bei den durchgeführten Arbeiten zum elektrochemischen Reduktionsverhalten betrug die Endkonzentration der Nitroxide jeweils $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und die Ionenstärke wurde durch Zusatz von KCl bei allen DPP-Messungen annähernd konstant gehalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 47 und 48 dargestellt.

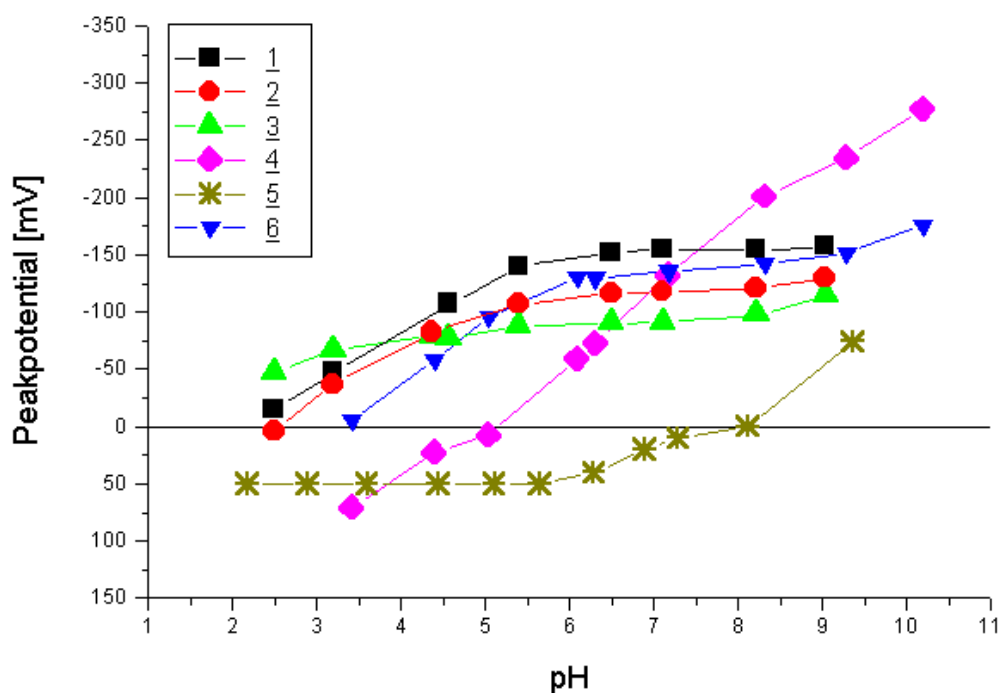


Abbildung 47: Peakpotentiale der Piperidinnitroxide in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösung (Meßbedingungen: Arbeitselektrode DME; Referenzelektrode Ag/ AgCl; 3 N KCl-Lösung; Hilfselektrode Pt-Draht; Schrittweite 1 s; Schrittamplitude 10 mV; Pulsamplitude -50 mV).

Als Ergebnis der DPP-Untersuchungen konnte eine deutliche Abhängigkeit der gemessenen Peakpotentiale vom pH-Wert der verwendeten Pufferlösung festgestellt werden. Aus den Resultaten der durchgeführten Untersuchungen können folgende zwei Hauptaussagen abgeleitet werden:

Die Peakpotentiale nehmen mit steigenden pH-Wert negativere Werte an, d.h. die elektrochemische Reduktion der Nitroxylfunktion zum korrespondierendem Hydroxylamin wird mit abnehmender Protonenkonzentration erschwert.

Die elektronenziehenden Substituenten am Piperidinring bewirken eine Verschiebung der Peakpotentiale zu positiveren Werten. Dieser Effekt der Substituenten ist besonders offensichtlich zwischen den pH-Werten 5 und 10.

Die letztendlich gemessenen DPP-Kurven resultieren somit aus der Überlagerung von zwei verschiedenen Effekten. Bei pH Werten kleiner 2 muß die beginnende Disproportionierung der Nitroxide zum Hydroxylamin und dem entsprechenden Oxammoniumkation in Betracht gezogen werden. Die Interpretation wird in diesem Bereich somit zusätzlich erschwert.

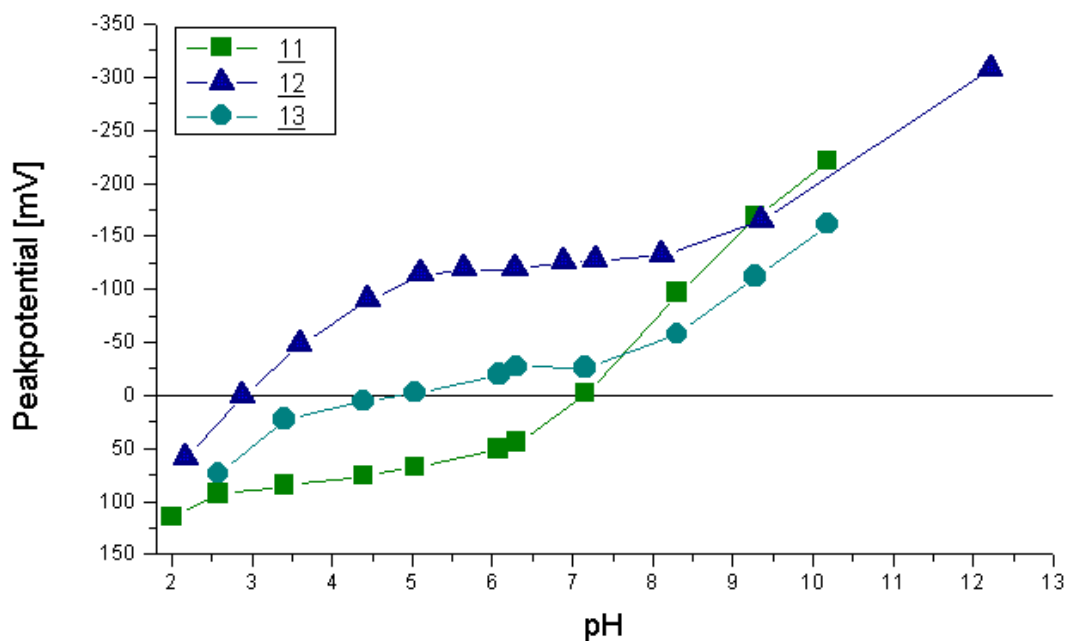
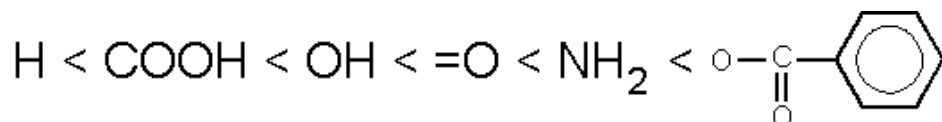


Abbildung 48: Peakpotentiale der Imidazol- (11 und 12) und Imidazolidinnitroxide (13) in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösung (Meßbedingungen: Arbeitselektrode DME; Referenzelektrode Ag/ AgCl; 3 N KCl-Lösung; Hilfselektrode Pt-Draht; Schrittweite 1 s; Schrittamplitude 10 mV; Pulsamplitude -50 mV).

Weiterhin sollte unter Anwendung der HAMMETT-Beziehung über die entsprechende Substituentenkonstante σ eine Abschätzung des Substituenteneinflusses auf das elektrochemische Reduktionsverhalten der Nitroxide möglich sein. Die Abschätzung besitzt jedoch nur orientierenden Charakter, da die HAMMETT-Beziehung strenggenommen nur für aromatische Systeme definiert ist.

Die untersuchten Substituenten verschieben das DPP-Peakpotential der Nitroxide in folgender Reihenfolge (für pH= 6,0) in Richtung auf positivere Werte:

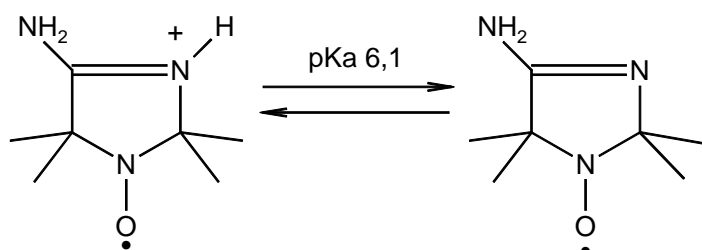


Diese Reihenfolge entspricht nicht, der der Hammett'schen Substituentenkonstanten wie zu erwarten wäre, wenn die Substituenten und die Nitroxylradikalgruppe über ein aromatisches System verknüpft wären. Dies legt den Schluß nahe, daß nicht nur elektronische Effekte den offensichtlichen Substituenteneinfluß erklären können. Weitere Effekte (wie z.B. sterische bzw. intermolekulare Wechselwirkungen) müssen hier berücksichtigt werden.

Ein besonderes elektrochemisches Redoxverhalten zeigt der Benzoesäureester **5**. Der elektronenziehende Einfluß des Benzoylrestes ist hier so stark, daß das Peakpotential um ca. 200 mV in Richtung positiver Werte verschoben wird und der Einfluß der Protonenkonzentration bei pH < 6 vollständig nivelliert wird. Erst ab pH > 6 ist eine Abhängigkeit der Peakpotentiale vom pH-Wert meßbar.

Bei der Untersuchung des elektrochemischen Redoxverhaltens zeigten die pH-sensitiven Imidazolin- und Imidazolidinnitroxide ebenfalls einen starken Einfluß der Substituenten. Bei den Imidazolverbindungen wird dieser Einfluß durch die Doppelbindung im Ringsystem verstärkt. So werden die Peakpotentiale im pH-Bereich 4- 6 von ca. 50-100 mV für **11** (elektronenziehende Aminogruppe in 4-Position) nach -50 bis -120 mV für **12** (elektronenschiebende Methylgruppe in 4-Position) verschoben.

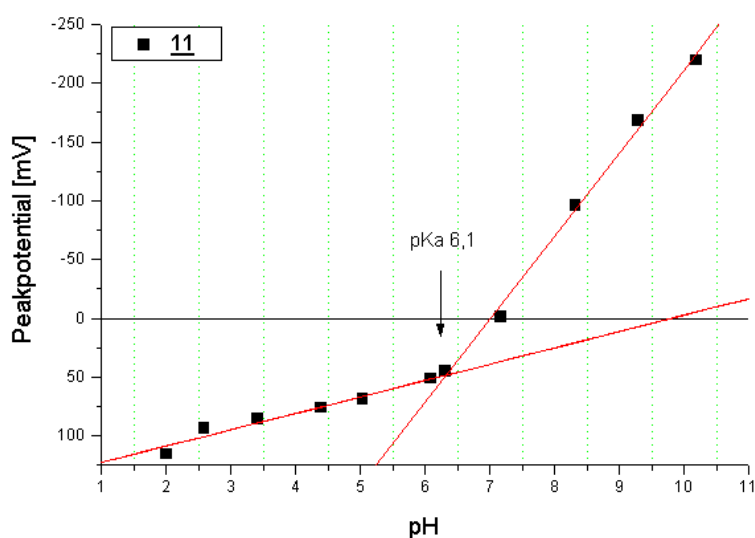
Die Hyperfeinaufspaltung a_N des ESR-Signals von **11** repräsentiert die Wechselwirkung von ungepaartem Elektron und dem Kernspin des Stickstoff N 1.



Wird bei zunehmender Wasserstoffionenkonzentration der Stickstoff N 3 protoniert (siehe

auch Abbildung 49) kommt es zu einer weiteren Wechselwirkung zwischen dem Stickstoff N 1 und dem Stickstoff N 3. Als Folge nimmt die Elektronendichte am Stickstoff N 1 ab. Dieser Effekt wird sowohl elektrochemisch in einem veränderten Reduktionsverhalten an der Quecksilberelektrode, als auch spektroskopisch als Abnahme der Hyperfeinkopplungskonstante a_N des ESR-Signals von **11** sichtbar.

A



B

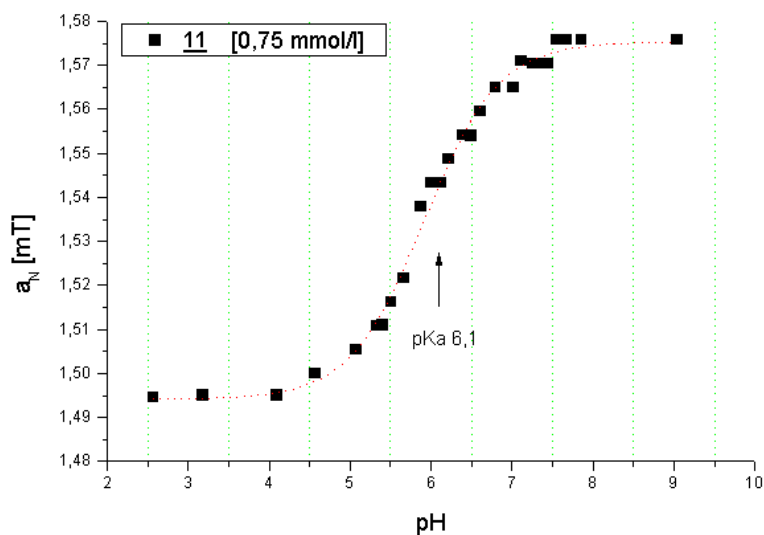


Abbildung 49: Einfluß des pKa-Wertes von **11** (pK_a 6,1) auf das elektrochemische Reduktionsverhalten (A) an der Quecksilbertropfelektrode und die Hyperfeinkopplungskonstante a_N des ESR-Signals (B) der Nitroxylfunktion.

5.3 Chemisches Reduktionsverhalten von Nitroxylradikalen

5.3.1 Einfluß von pH-Wert auf die Reduktion

Für die Untersuchungen zum chemischen Reduktionsverhalten von Nitroxylradikalen bietet sich das Anion der Ascorbinsäure an, da diese Verbindung auch für die nichtenzymatische In-vitro- und In-vivo-Biotransformation von Nitroxylradikalen, so z.B. in Erythrozyten [84, 85] oder Keratinozyten [86], von besonderer Bedeutung ist. Als weiterer Vorteil ist anzusehen, daß das Reaktionsverhalten von Ascorbinsäure sehr gut untersucht ist und die Verbindung in hoher Reinheit erhältlich ist.

Aufgrund der Bedeutung der Ascorbinsäure als Antioxidans und *free radical scavenger* wurde die Reduktion von Nitroxylradikalen mit Ascorbinsäure schon von einer Reihe von Arbeitsgruppen untersucht [87, 88].

Die Reaktion zwischen Nitroxylradikalen und Ascorbinsäure sollte eine pH-Wertabhängigkeit zeigen, da das Ascorbinsäureanion, das eigentliche Reduktionsmittel für die Nitroxylfunktion darstellt.

Der Reaktionsmechanismus zwischen Piperidinnitroxiden und Ascorbinsäure ist in der folgenden Abbildung 50 schematisch dargestellt.

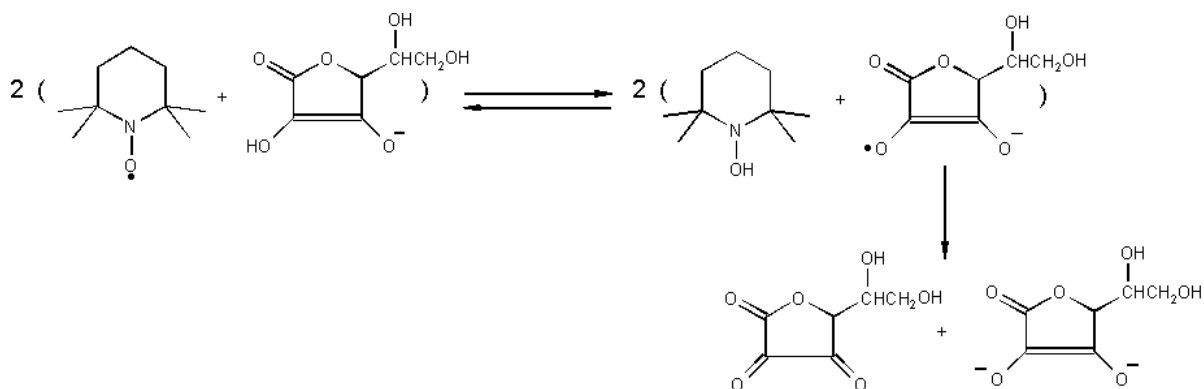


Abbildung 50: Schema (nach Baur *et al.* [78]) für die Reaktion von **1** mit Ascorbat-Ionen unter Bildung der Hydroxylamins und eines reaktiven Ascorbinsäureradikals. Das Ascorbinsäureradikal reagiert schnell mit einem weiteren Ascorbinsäureradikal zu Dehydroascorbinsäure und dem Ascorbinsäuredianion, welches bei pH 7 umgehend protoniert wird.

Nach den oben angeführten Arbeiten führt die Umsetzung von Nitroxiden mit Ascorbinsäure ausschließlich zum diamagnetischen Hydroxylamin. Vielfach bediente man sich sogar dieser Reduktionsreaktion zur Synthese des Hydroxylamins.

Da aber nur wenige Literaturhinweise über eine Strukturaufklärung der diamagnetischen

Produkte vorliegen, wurden zu dieser Problematik eigene Arbeiten durchgeführt. Hierzu wurden die untersuchten Nitroxide ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) mit Ascorbinsäure ($50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) bei pH-Werten von 3 - 10 (Aqua bidest.; Zusatz von 0,1 N NaOH bzw. 0,1 N HCl) und Raumtemperatur umgesetzt. Jeweils nach 5, 30 und 60 min wurde eine Probe ($1 \mu\text{l}$) aus dem Reaktionsgemisch entnommen und direkt mittels GC-MS und ESR-Spektroskopie untersucht. Hierbei konnte neben dem Nitroxid als nichtumgesetzte Ausgangsverbindung nur das korrespondierende diamagnetische Hydroxylamin als Reaktionsprodukt festgestellt werden (siehe Abbildung 51).

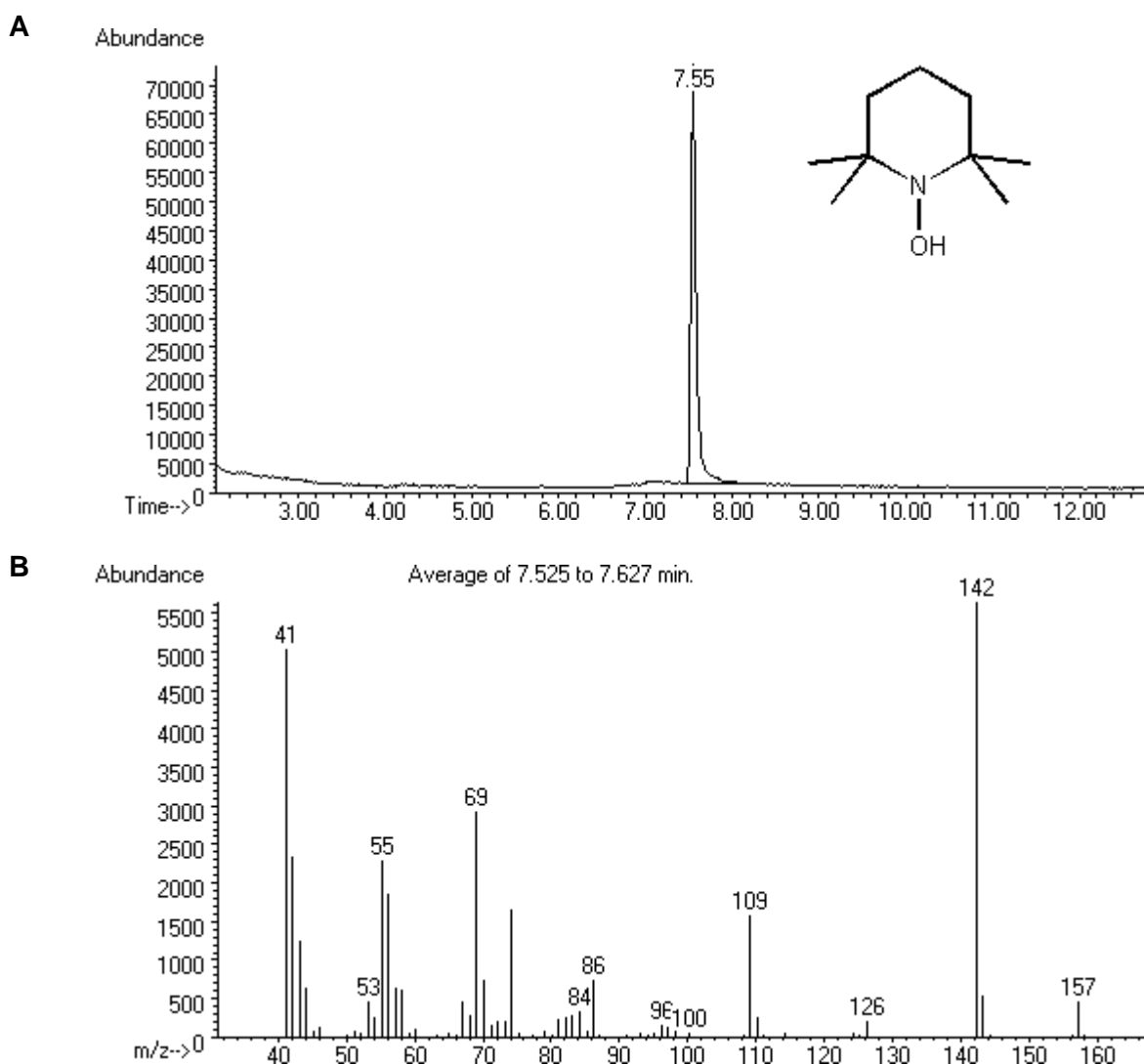


Abbildung 51: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum des Hauptpeaks (B) nach Umsetzung von 1 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) mit Ascorbinsäure ($50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; 30 min bei Raumtemperatur). Es entsteht das korrespondierende Hydroxylamin 1B.

Im folgendem wurden Untersuchungen zur Kinetik der Reaktion zwischen Nitroxylradikal und Ascorbinsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert durchgeführt. In der Vergangenheit wurde z.B. von *Morris et al.* versucht im Rahmen von Reduktionsversuchen sowohl den Substituenteneinfluß (als σ) mit den Reaktionskonstanten $k_{\text{Reduktion}}$, als auch die Halbstufenpotentiale $E_{1/2}$ mit den Reaktionskonstanten $k_{\text{Reduktion}}$ zu korrelieren. Es bleibt aber kritisch anzumerken, daß in diesen Arbeiten weder die pH-Werte noch die bestimmten Korrelationskoeffizienten angegeben wurden. Somit lassen sich diese Befunde nicht abschließend bewerten.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Britton-Robinson-Puffer hergestellt und der pH-Wert mittels Wasserstoffelektrode überprüft und eingestellt. Die Nitroxide wurden in den entsprechenden Puffern gelöst ($0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), mit Ascorbinsäure ($5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ in Wasser + $0,1 \text{ N NaOH}$ zur pH-Korrektur) intensiv gemischt (Vortexer, 10 s) und die ESR-Signalintensität gemessen. Die erste Messung erfolgte nach zwei Minuten und anschließend jeweils alle 30 Sekunden über einen Zeitraum von 5 Minuten. Das Reaktionsgeschehen zeigte einen Verlauf Pseudo-1.Ordnung, wobei die Reaktionskonstante eine deutliche pH-Abhängigkeit aufwies. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Literaturbefunden nach denen die Reduktion, bei entsprechend hohen Ascorbat-Ionenüberschuß, einen Verlauf Pseudo-1.Ordnung aufweist [89]. Ist die Konzentration des Reduktionsmittels (Ascorbinsäure) dagegen annähernd gleich groß, so wurde von den Autoren eine Reaktion zweiter Ordnung festgestellt. Die Geschwindigkeit der Reduktion wird in diesem Fall auch durch die Konzentration des Ascorbinsäureanions bestimmt.

Der Verlauf der Reaktion und die starke Abhängigkeit vom pH-Wert ist beispielhaft für die Reduktion von Nitroxid **2** mittels Ascorbinsäure in Abbildung 52 dargestellt.

Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{Reduktion}}$ wurden nach Logarithmierung durch lineare Kurvenanpassung bestimmt und sind in der folgenden Abbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Die Untersuchungsergebnisse zeigen eindeutig den Einfluß von Substituenten am Ringsystem sowie dem aktuellen Protonenangebot auf das Reduktionsverhalten von Nitroxiden in wäßriger Umgebung. Die pH-Werte von 4- 6 sind dabei von besonderem Interesse, da alle untersuchten Verbindungen in diesem Bereich eine offensichtliche Änderung des Reaktionsverhaltens aufweisen. Während die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmendem Protonenangebot bis pH 5 zunimmt, fällt sie bei weiter abnehmenden pH-Werten wieder ab ($\rightarrow 0$; vgl. Abbildung 53 A).

Die sprunghafte Änderung des Reduktionsverhaltens der Nitroxide im pH-Bereich 4- 6 läßt

sich auf die Dissoziation der Ascorbinsäure (pK_a -Wert der Ascorbinsäure = 4,17 [90]) zurückführen, da das Ascorbinsäureanion (bzw. Ascorbat-Ion), das eigentliche Reduktionsmittel bei der Reaktion mit der Nitroxylfunktion darstellt.

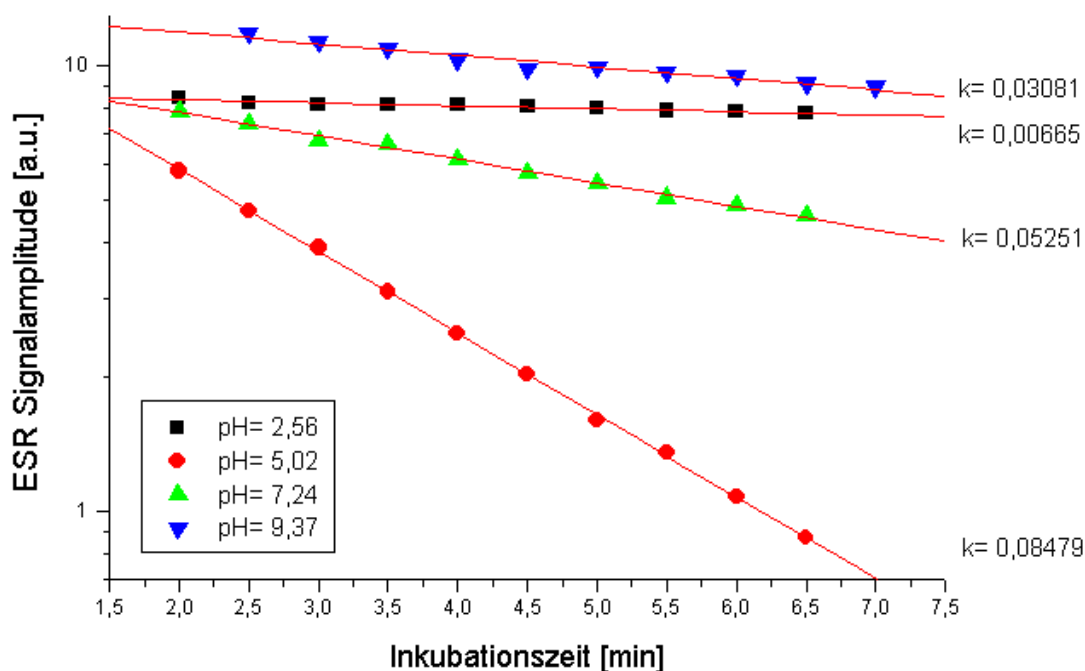


Abbildung 52: Abnahme der ESR-Signalamplitude von **2** (initial $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) nach Zusatz von Ascorbinsäure (initial $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Pufferlösungen verschiedener pH-Werte bei 20°C .

Im alkalischen Bereich liegt die Ascorbinsäure weitgehend deprotoniert vor, so daß der Mangel an verfügbaren Protonen (und nicht die Bereitstellung von Elektronen) für die Hydroxylaminbildung den eigentlichen limitierenden Faktor der Reaktion in diesem pH-Bereich darstellt. Im sauren pH-Bereich wird die Dissoziation der Ascorbinsäure durch den Überschuß an Protonen zurückgedrängt. Damit nimmt bei gleichzeitiger Zunahme der Protonenkonzentration die Konzentration der Reduktionsmittels (Ascorbat-Ion) ab.

In der Abbildung 53 B sind die Werte der gemessenen Reduktionskonstanten für den theoretischen Fall korrigiert worden, wenn keine pH-abhängige Protonierung des Ascorbinsäureanions erfolgt und das entsprechende Anion immer zu 100% vorliegt.

Für die Berechnungen wurde das folgende ^aGleichungssystem verwendet:

$$k_{corrected} = \frac{k_{reduction}}{c_0(0) - c_N(0)} \cdot \lg \frac{c_N(0)}{c_0(0)} \cdot (1 + 10^{pK_a - pH})$$

$$c_0(0) = c_{asc.anion} + c_{asc.acid}(t = 0)$$

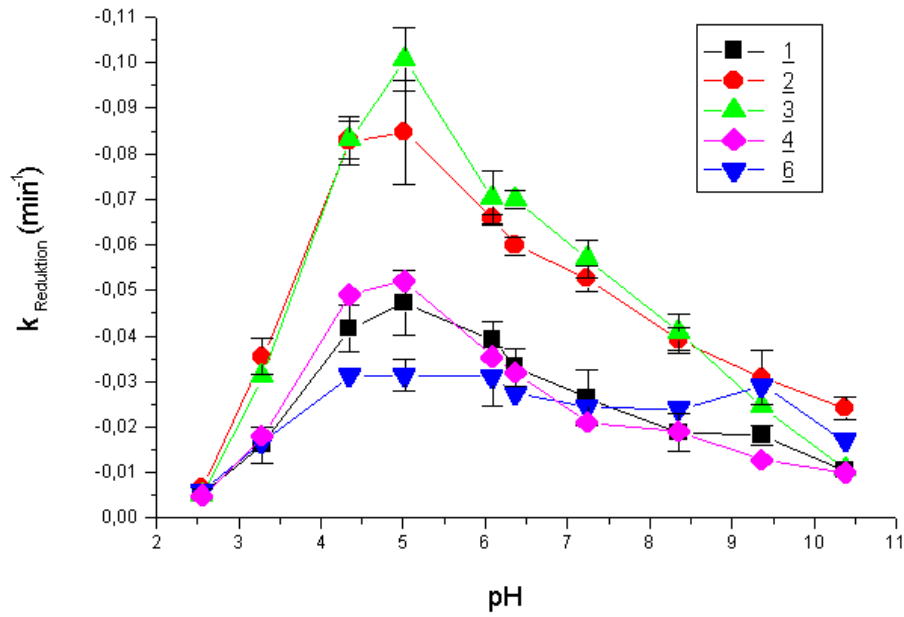
$$c_N(0) = c_{nitroxide}(t = 0)$$

Weiterhin ist der Substituenteneinfluß bei Nitroxid 2 und 3 im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung 1 im pH-Bereich von 4- 5 besonders offensichtlich. Die elektronenziehenden Substituenten erleichtern die Elektronenaufnahme am Sauerstoff der Nitroxylfunktion und erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktion.

Der Effekt der Aminogruppe bei Nitroxid 4 bzw. der Carboxylfunktion bei Verbindung 6 auf die Lage des Peakpotentials war dagegen bei den eigenen Untersuchungen nur wenig ausgeprägt im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [91]. Das abweichende chemische Reduktionsverhalten dieser beiden Nitroxide könnte durch die Ladung dieser Verbindungen aufgrund einer Protonierung bzw. Deprotonierung zu erklären sein. Somit würden diese ionischen Wechselwirkungen die eigentliche Reduktion der Nitroxylfunktion überlagern. Eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem elektrochemischen und dem chemischen Reduktionsverhalten läßt sich somit nur für die ungeladenen Verbindungen belegen.

^a An dieser Stelle möchte ich Prof. Surmann für die Diskussion der Befunde und die Entwicklung des im folgendem verwendeten Gleichungssystems danken.

A



B

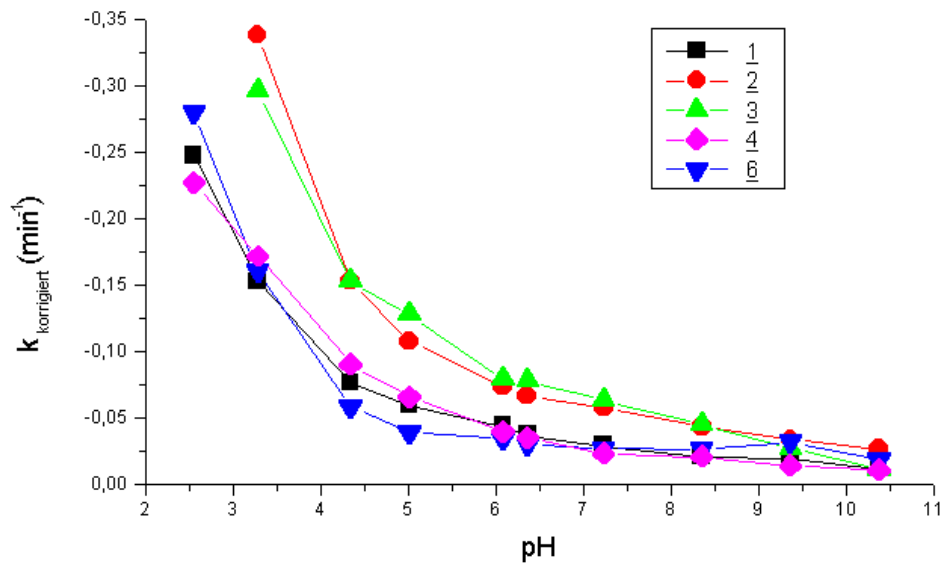


Abbildung 53: (A) Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{Reduktion}}$ der Reaktion von Nitroxylradikalen mit Ascorbinsäure bestimmt durch Abnahme der ESR-Signalamplitude im X-Band und (B) korrigierte Werte für $k_{\text{Reduktion}}$, welche die pH abhängige Dissoziation der Ascorbinsäure berücksichtigen.

5.3.2 Untersuchungen zur Protonenübertragung

Von besonderer Bedeutung für das Reduktionsgeschehen ist neben der Übertragung von Elektronen durch das Reduktionsmittel die Bereitstellung von Protonen durch den Reaktionspartner bzw. das Lösungsmittel. Die Herkunft des Wasserstoffs bei den gebildeten Nitroxiden wurde bisher in der Literatur nicht näher untersucht. Die Aufnahme eines einzelnen Protons nach vorheriger Elektronenübertragung ist als wahrscheinlich anzusehen, wobei aber auch die Übertragung eines Wasserstoffatoms nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Im folgenden wurden die Reaktionsprodukte von Nitroxiden nach vorheriger Reduktion mit Ascorbinsäure in D₂O (99,8 %) bei Raumtemperatur mit Hilfe der GC-MS untersucht. Hierzu wurden die Nitroxide (10 mmol•l⁻¹ in D₂O) mit Ascorbinsäure (50 mmol•l⁻¹ in D₂O) bei pH 6- 7 inkubiert. Die Probennahme erfolgte jeweils im Abstand von 5 min mit anschließender direkter GC-MS-Analyse. Die Retentionszeiten der gebildeten Hydroxylamine und die entsprechenden Massenspektren wurden mit Referenzsubstanzen verglichen (Abbildung 54).

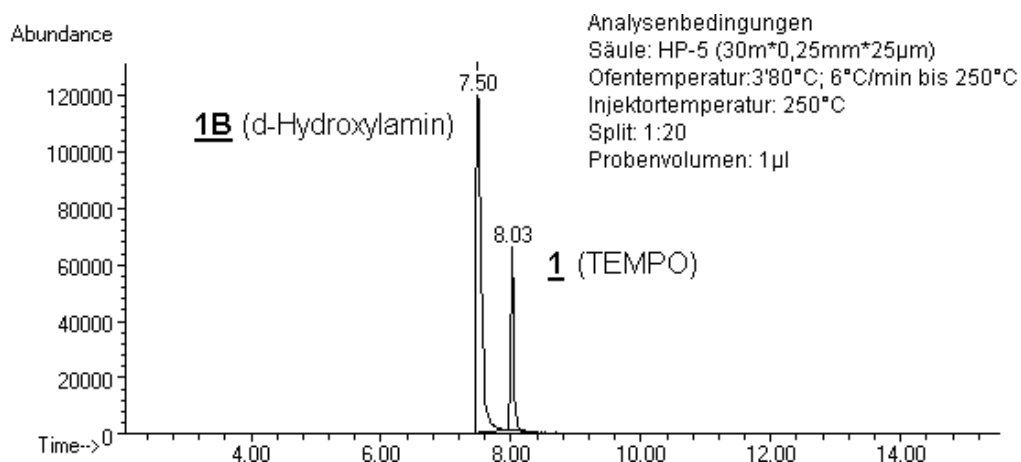
Bei allen Untersuchungen wurde neben der Ausgangsverbindung nur ein weiterer GC-Peak detektiert. Dabei handelte es sich in allen Fällen um das deuterierte Hydroxylamin, wobei aber nur an der Hydroxylfunktion ein Deuteriumaustausch stattgefunden hat. Dieses Ergebnis wird durch das MS belegt, da ausschließlich Bruchstücke mit intakter N-OH-Funktion einen um 1 höheren m/z-Wert aufweisen (Molekülpeak M, m/z= 158; M- •CH₃ (Schema a₃), m/z= 143; M- (•CH₃+C₄H₈)(Schema a₃), m/z= 87). Das nichtdeuterierte Hydroxylamin wurde nicht detektiert (siehe Fragmentierungsschemata unter 3.1.3).

Aus den vorliegenden Ergebnisse wurde folgende Arbeitshypothese formuliert:

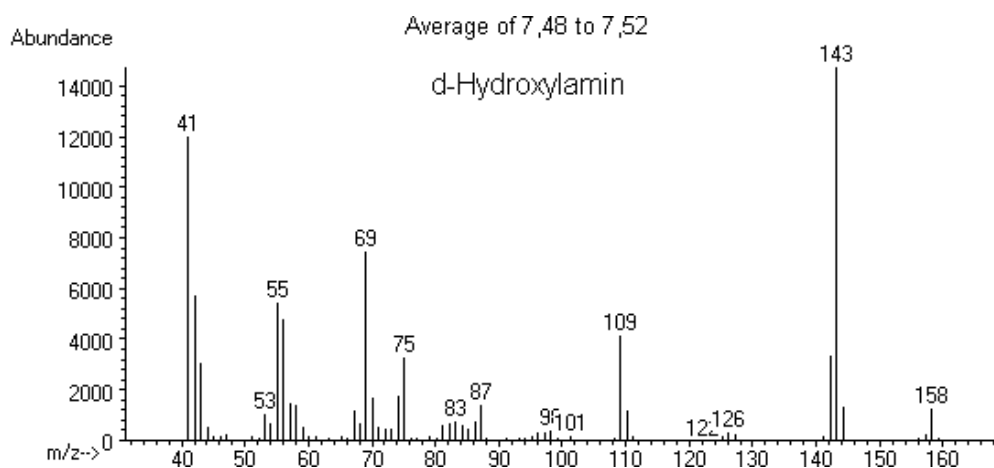
Die Protonenübertragung erfolgt nach vorhergehender Elektronenaufnahme direkt aus dem wässrigen Lösungsmittel.

Reduktionsverhalten von Nitroxylradikalen

A



B



C

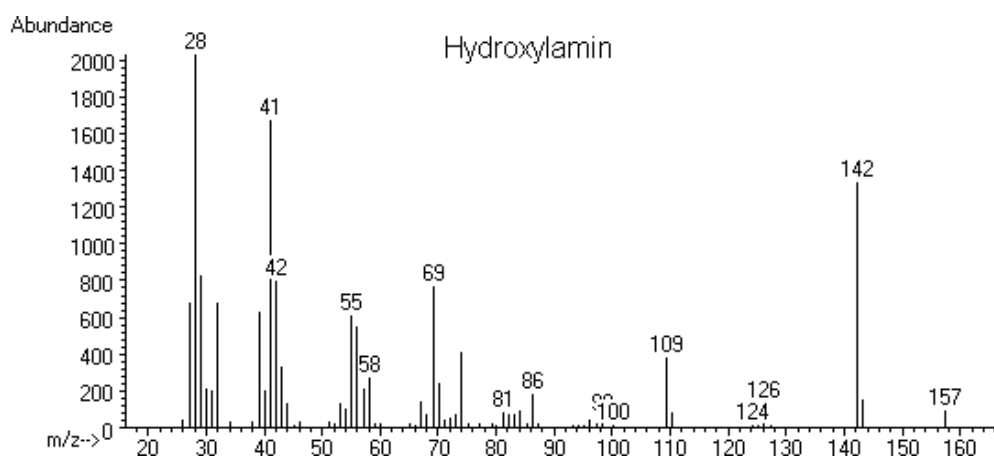


Abbildung 54: GC-MS-Untersuchung von Nitroxid **1** nach Reduktion mit Ascorbinsäure in D₂O (99,8 %). (A) GC nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur, (B) MS des gebildeten **1B** Derivates nach Deuteriumaustausch an der Hydroxylfunktion, (C) MS des synthetisierten Hydroxylamins **1B** als Vergleich.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde **1B** in H₂O, in D₂O (99,8 %) und in einer 1:1

Mischung aus beiden gelöst und nach 0,5, 1, 2, 5, 10 und 30 min mittels GC-MS analysiert. Schon bei der ersten Probe (30 s in D₂O) wurde ausschließlich die deuterierte Verbindung detektiert. In der Mischung betrug das Verhältnis von **1B** zu deuterierten **1B** nach 30 s 1:1. Der Austausch des Protons der Hydroxylgruppe gegen Deuterium des Lösungsmittels erfolgt also wesentlich schneller als die analytische Erfassung. Das Proton ist somit sehr beweglich. Auf diese hohe Beweglichkeit deuten auch die Ergebnisse der ¹H-NMR-Untersuchungen zum Protonenaustausch hin (siehe Kapitel 1.1.4).

Die eingangs aufgestellte Arbeitshypothese konnte somit nicht untermauert werden. Eine radikalische Abstraktion des Wasserstoffatoms aus dem Lösungsmittel ist weiterhin als möglich anzusehen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen konnte diese Reaktion jedoch nicht nachgewiesen werden.

5.4 Schlußfolgerungen

Anhand der durchgeführten Untersuchungen zum elektrochemischen und chemischen Reduktionsverhalten von Piperidin-, Imidazolin- und Imidazolidin-Nitoxylradikalen in Abhängigkeit vom pH-Wert können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

Paraständige Substituenten beeinflussen das Reduktionsverhalten von Nitroxiden, wobei elektronenziehende Gruppen erwartungsgemäß die Reduktion erleichtern.

Die elektrochemische Reduktion weist über den gesamten untersuchten pH-Bereich eine deutliche pH-Abhängigkeit auf. Mit abnehmendem pH-Wert der Untersuchungslösung nimmt die Geschwindigkeit der Reduktion der Nitroxide zum diamagnetischen Hydroxylamin zu. Limitierender Faktor für die Reduktionsreaktion ist in erster Linie die Verfügbarkeit von Protonen.

Die pH-sensitive Nitroxide mit Imidazolin- und ImidazolidinGrundstruktur zeigen bei der elektrochemischen Reduktion einen charakteristischen Wechsel im Reaktionsverhalten, der durch die Protonierung bzw. Deprotonierung des Stickstoffs in 3-Position bewirkt wird. So ist bei Nitroxid **11** im sauren pH-Bereich (pH < pK_a) die Reduktionsmöglichkeit der Radikalfunktion sichtbar eingeschränkt.

Die Geschwindigkeit der Reduktion durch Ascorbinsäure besitzt bei pH 4- 5 ein Maximum und nimmt mit höheren pH-Werten ab. Im pH-Bereich < 4- 5 liegt die Ascorbinsäure, bedingt durch einen pK_a von 4,17, weitgehend protoniert vor, und die Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktionsreaktion verringert sich mit abnehmenden pH-Wert ebenfalls wieder.

Das Proton der Hydroxylaminfunktion besitzt eine hohe Beweglichkeit und wird leicht gegen Protonen des wäßrigen Lösungsmittels ausgetauscht.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen zum chemischen und elektrochemischen Reduktionsverhalten von Nitroxiden läßt sich schlußfolgern, daß für die chemische und biochemische Stabilität der Nitroxylradikale sowohl die Substituenten am Grundkörper, als auch das jeweilige Ringsystem der Verbindung selbst von besonderer Bedeutung sind.

Der pH-Wert des Untersuchungsmediums besitzt ebenfalls einen großen Einfluß auf die Stabilität und Reaktivität der Radikalfunktion, wobei das Ausmaß stark von der verwendeten Verbindung abhängt. Allgemein nimmt aber das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Reduktion mit abnehmendem pH-Wert zu.

Da in einem untersuchten biologischen System der pH-Wert durchaus stark variieren kann (u.U. 2- 3 pH-Einheiten an der Oberfläche von Phospholipidmembranen) und der "wahre" pH-Wert am Reduktionsort meist nicht bekannt ist, ist hier die Auswahl und Anwendung für das jeweilige Untersuchungssystem geeigneter Nitroxide besonders wichtig. So wäre z.B. im Falle starker pH-Veränderungen der Einsatz einer Verbindung mit geringen pH-Response auf die Reduktionskinetik sinnvoll.

Beim Einsatz von pH-sensitiven Nitroxiden mit Imidazolin- und Imidazolidinstruktur ist zusätzlich die Veränderung des Reduktionsverhaltens, durch den protonierbaren Stickstoff in 3-Position des Grundkörpers zu berücksichtigen.

6 Untersuchungen zur In-vitro-Biotransformation von Nitroxylradikalen

6.1 Mikrobielle Metabolisierung in Pilzkulturen (Gattung Cunninghamamella)

Es existieren in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur mikrobiellen Biotransformation von Nitroxylradikalen [92]. Mikroorganismen besitzen aber als Modellsysteme den unschätzbaren Vorteil der einfachen Kultivierung und Handhabung, wobei sie außerdem komplette intakte Organismen darstellen und in vielen Fällen auch über vergleichbare und in einigen Fällen sogar sehr ähnliche Enzymsysteme wie der Säugerorganismus verfügen [93]. Für die Untersuchungen zur mikrobiellen Biotransformation von Nitroxiden wurden verschiedene Pilzstämme der Gattung Cunninghamamella (Ordnung Mucorales) ausgewählt und als Submerskultur verwendet (siehe Abbildung 38). Dies waren *C. elegans* ATCC 9245 (USA), *C. elegans* P 71 (Uni Jena), *C. elegans* P 93 (Uni Jena) sowie *C.echinulata* ATCC 9244. Diese Pilzarten verfügen nach bisherigen Erkenntnissen, neben weiteren Vertretern der Gattung Cunninghamamella, über ein säugerähnliches mikrosomales Monooxygenasesystem [94, 95, 96].

Für die Metabolisierung von Nitroxiden, zumindest hinsichtlich ihrer Reduktion zu diamagnetischen Hydroxylaminen, ist die mitochondriale Atmungskette von besonderer Bedeutung (siehe hierzu auch Kapitel 6.5). Somit boten sich die Vertreter dieser Pilzgattung als einfaches und gut handhabbares Modellsystem für prädiaktive Metabolisierungsuntersuchungen von Nitroxylradikalen an [97, 98].

Zur Vorbereitung für die Untersuchungen wurden die Pilzstämme 5 Tage auf einem Schrägagar (Malzextrakt-Kulturmedium, pH 5,8- 6,0) rekultiviert. Die Sporen wurden mit 3- 5 ml flüssigem Kulturmedium (Sabouraud-Dextrose-Boullion, pH 5,7 ± 0,2) abgespült. In ca. 75 ml Kulturmedium wurde der Pilzstamm als Phase-I-Kultur über 48- 72 Stunden bei 27°C im Inkubationsschüttler (ca. 100 min⁻¹) als Submerskultur unter aeroben Bedingungen kultiviert (siehe Kultivierungsschema; Abbildung 55).

Für die Untersuchung von Biotransformationsprodukten wurde, nach Zugabe der untersuchten Verbindungen (Substanzen gelöst in DMSO, Endkonzentration im Kulturmedium 100 µmol·l⁻¹), die Phase-II-Pilzkultur ebenfalls im Inkubationsschüttler bei 27 °C unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die Probennahme erfolgte unter sterilen Bedingungen im 30-Minutenabstand bis 6 h nach Zugabe der Substanzen sowie nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 h. Anschließend wurde die Probenvorbereitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (Extrelut[®]-1, -3, -20-Säulen) und die chromatographische Analytik durchgeführt.

In-vitro-Biotransformation von Nitroxylradikalen

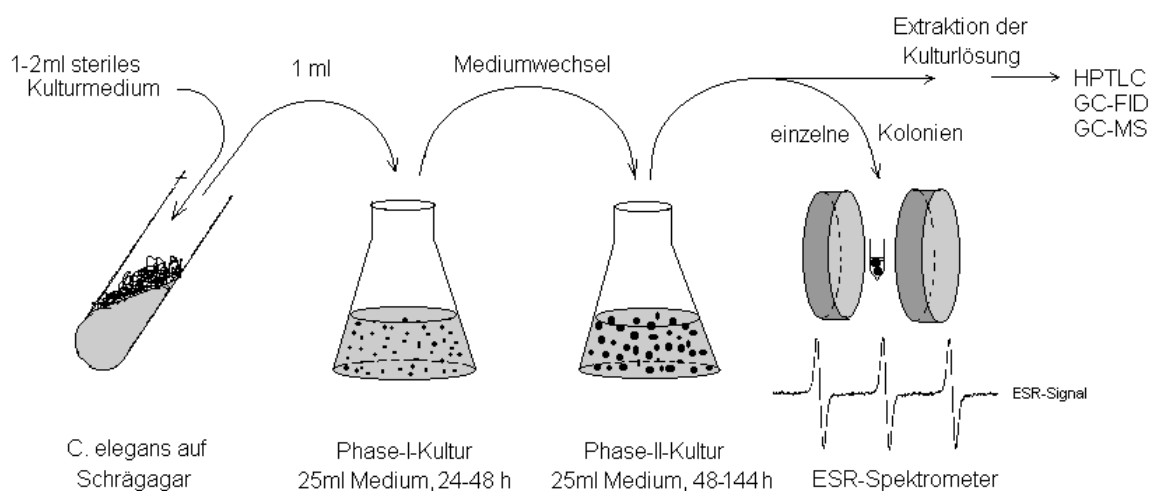


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Kultivierung von *Cunninghamella* sowie der durchgeführten Untersuchungen zur Metabolisierung von Nitroxylradikalen.

Die Abbildung 56 zeigt das Gaschromatogramm eines Extraktes nach Inkubation von Verbindung **1**. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte bzw. Metabolite erfolgte mittels GC-MS und ^1H -NMR. Die MS-Ergebnisse für die Verbindungen **2B** und **3B** sind in Tabelle 27 bzw. 28 dargestellt.

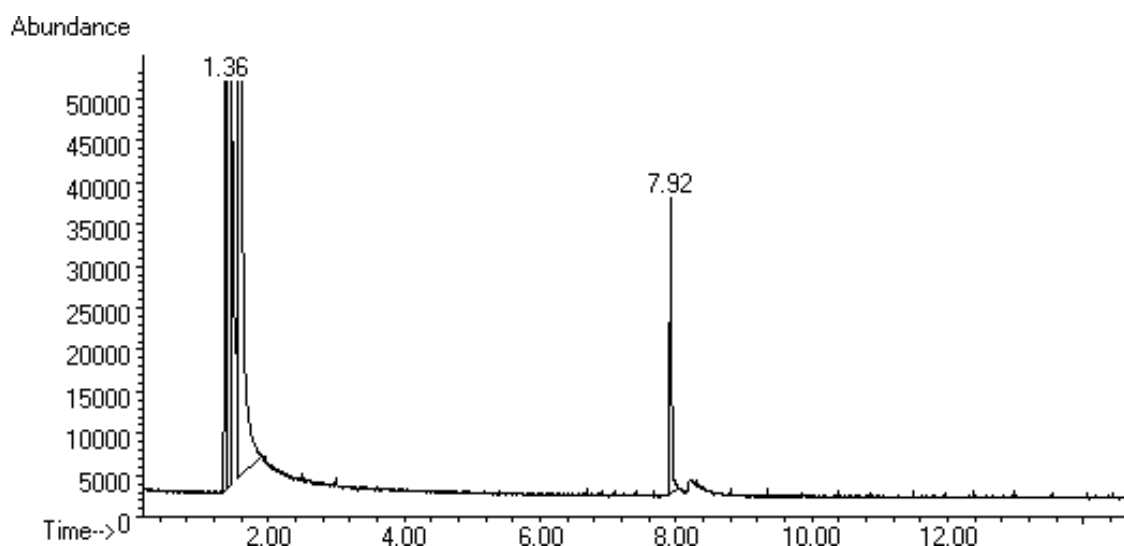


Abbildung 56: Gaschromatogramm des Extraktes nach Inkubation von Nitroxid **1** mit *Cunninghamella elegans* (Inkubationszeit 72 h). Als einziges Produkt wurde das diamagnetische Hydroxylamin **1B** ($t_R = 7,9$ min) detektiert und mit Hilfe von MS- und NMR-Untersuchungen die chemische Struktur gesichert.

Tabelle 27: MS von Reaktionsprodukt **2B** (1,4-Dihydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin).

m/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
174	2	Isotopenpeak von M	-
173	16	M	C ₉ H ₁₉ NO ₂
172	1	M - H ⁺	C ₉ H ₁₈ NO ₂
159	10	M - [•] CH ₃ + 1, Isotopenpeak	-
158	100	M - [•] CH ₃ , a ₃	C ₈ H ₁₆ NO ₂
142	3	M - CH ₂ OH [•] , c ₃	C ₈ H ₁₆ NO
141	3	M - CH ₃ OH, c ₃	C ₈ H ₁₅ NO
140	37	M - NH ₂ OH, a ₅	C ₉ H ₁₆ O
125	1	M - ([•] CH ₃ + NH ₂ OH), a ₄	C ₈ H ₁₃ O
108	22		-
107	29		-
102	96	M - ([•] CH ₃ + C ₄ H ₈), a ₃	C ₄ H ₈ NO ₂
100	2	M - (C ₃ H ₆ NOH), a ₆	C ₆ H ₁₂ O
98	18	M - (CH ₂ OH [•] + C ₂ H ₄), c ₃	C ₆ H ₁₂ N
85	12	M - (NH ₂ OH + C ₄ H ₇), a ₅ M - (C ₃ H ₆ NOH + [•] CH ₃), a ₆	C ₅ H ₉ O
84	6		-
82	5		-
81	6		-
74	30	M - C ₆ H ₁₀ OH, a ₂	C ₃ H ₈ NO
71	17		-
67	9		-
58	20	M - (CH ₂ OH [•] + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₄), c ₃	C ₃ H ₈ N
57	55		C ₃ H ₆ NH
56	57	M - (C ₃ H ₆ NOH + C ₂ H ₃ OH), a ₆	C ₄ H ₈
55	24		C ₄ H ₇
42	48	M - (C ₃ H ₆ NOH + C ₃ H ₅ OH), a ₆	C ₃ H ₅
41	85	M - (CH ₂ OH [•] + C ₂ H ₄ + C ₃ H ₆ NH), c ₃ M - (C ₃ H ₆ NOH + C ₃ H ₆ OH), a ₆	C ₃ H ₅

¹ m/z 158 = 100%**Tabelle 28:** MS von Reaktionsprodukt **3B** (1-Hydroxy-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin).

m/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
172	2	M + 1, Isotopenpeak	
171	16	M	C ₉ H ₁₇ NO ₂
170	1	M - H ⁺	C ₉ H ₁₆ NO ₂
157	7	M - [•] CH ₃ + 1, Isotopenpeak	
156	74	M - [•] CH ₃ , a ₃	C ₈ H ₁₄ NO ₂
140	2	M - [•] CH ₂ OH, c ₃ M - ([•] H + CH ₂ O), e ₂	C ₈ H ₁₄ NO
139	2	M - CH ₃ OH, c ₃	C ₈ H ₁₃ NO
138	3	M - NH ₂ OH, a ₅	C ₉ H ₁₄ O
123	2	M - (NH ₂ OH + [•] CH ₃), a ₅	C ₈ H ₁₁ O
115	2		-
114	3	M - ([•] H + C ₄ H ₈), e ₂ ; f ₁	C ₅ H ₈ NO ₂
100	78		-
98	2	M - (C ₃ H ₆ NOH), a ₆ M - ([•] CH ₂ OH + C ₂ H ₂ O), c ₃	C ₆ H ₁₀ O C ₆ H ₁₂ N
97	2	M - (CH ₃ OH + C ₂ H ₂ O), c ₃	C ₆ H ₁₁ N

In-vitro-Biotransformation von Nitroxylradikalen

86	2	M - ($\cdot\text{H} + \text{C}_4\text{H}_8 + \text{CO}$), f_1	$\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}$
83	96	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NOH} + \cdot\text{CH}_3$), a_6 M - ($\text{NH}_2\text{OH} + \text{C}_4\text{H}_7$), a_5 M - ($\cdot\text{H} + \text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$), f_1	$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}$
74	34		-
73	33		-
72	100	M - ($\cdot\text{H} + \text{C}_4\text{H}_8 + \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$), e_2	$\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}$
70	27		-
58	21	M - ($\cdot\text{CH}_2\text{OH} + \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{C}_3\text{H}_4$), c_3	$\text{C}_3\text{H}_8\text{N}$
57	13		$\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}$
56	77	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NOH} + \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$), a_6	C_4H_8
55	51		C_4H_7
43	37		-
42	55	M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NOH} + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}$), a_6	C_3H_6
41	74	M - ($\cdot\text{CH}_2\text{OH} + \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{C}_3\text{H}_6\text{NH}$), c_3 M - ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NOH} + \text{C}_3\text{H}_5\text{O}$), a_6	C_3H_5

¹ m/z 72= 100%

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß die Pilzgattung *Cunninghamella* die paramagnetischen Nitroxylradikale ausschließlich zu den diamagnetischen Hydroxylaminen reduziert. Weitere Reaktionsprodukte oder Metabolite konnten nicht nachgewiesen werden.

Im folgendem wurde der Mechanismus der mikrobiellen Metabolisierung näher untersucht. Für diese Untersuchungen wurden in erster Linie S-Band-ESR-Messungen durchgeführt. Dazu wurden mehrere Pilzkolonien der Phase-II-Submerskultur in ein 0,5 Eppendorfgefäß mit der Inkubationslösung (Pilzkulturmedium, Endkonzentration der untersuchten Nitroxide $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) überführt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und offenen Eppendorfgefäßen, beginnend 2 min nach Zugabe der Pilzkultur. Alle gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden auf Pilztrockengewicht in mg (lyophilisiert; Zeit 24 h) bezogen.

Die Reduktionsreaktion der Nitroxide läuft ausschließlich auf enzymatischen Weg ab, da eine vorhergehende thermische Inaktivierung (10 min, 80°C) der Pilzkultur oder eine Vorinkubation der Kultur mit Fungiziden die Bildung von diamagnetischen Produkten annähernd quantitativ unterbindet (Abbildung 57).

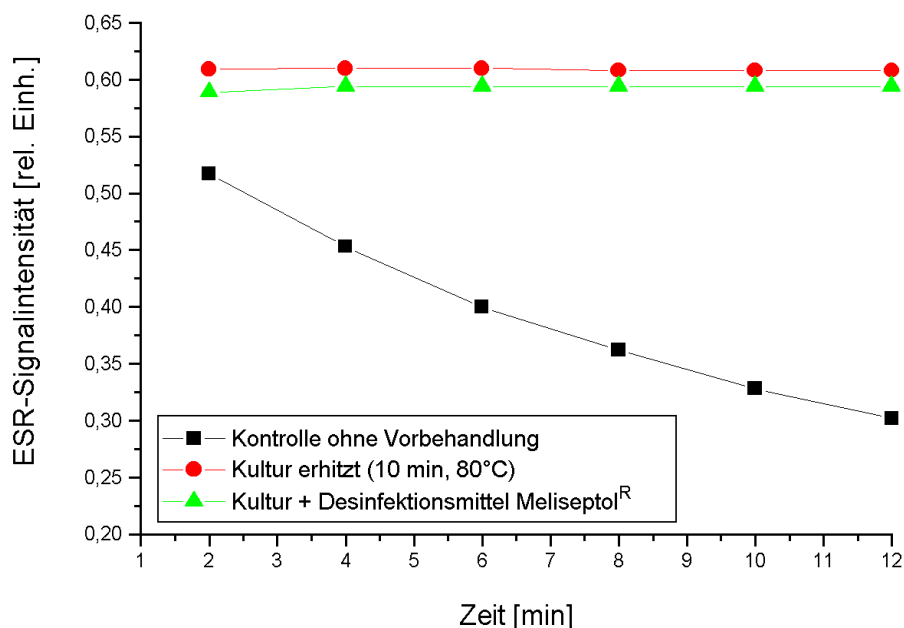


Abbildung 57: Biotransformation von Nitroxid 1 (initial $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) zu diamagnetischen Metaboliten durch *Cunninghamella elegans* ATCC 9245. Die Abnahme der ESR-Signalintensität von TEMPO wurde mittels S-Band-ESR-Spektroskopie in situ gemessen.

Eine Bildung des Hydroxylamins auf nichtenzymatischem Wege, z.B. mittels Ascorbat-Ionen oder freien Thiolgruppen, ist somit wenig wahrscheinlich, da einerseits die Vorbehandlung der Kultur (thermische Inaktivierung) diese Komponenten nicht inaktivieren sollte und andererseits die Pilzmembran als Diffusionsbarriere nicht mehr intakt sein sollte. Die Geschwindigkeit der Reduktion erfolgt nach einer Reaktion 1. Ordnung. Dabei zeigt die Geschwindigkeitskonstante der Reduktionsreaktion eine ausgesprochene Abhängigkeit von der eingesetzten Substrat-Konzentration und bei sehr hohen initialen Substrat-Konzentrationen ($>250 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) gehorcht das Reduktionsverhalten einer Reaktion Pseudo-0. Ordnung. Die Kinetik der Reduktion von Nitroxylradikalfunktion in Pilzkulturen lässt sich somit durch Anwendung der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik beschreiben.

Aus den erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten der Metabolisierung der Nitroxylradikalfunktion wurde, unter Berücksichtigung der jeweils eingesetzten Substratkonzentrationen, die initiale Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Die Ergebnisse sind beispielhaft für die drei Piperidinnitroxide 1, 2 und 3 in der Abbildung 58 als LINEWEAVER-BURK-Plot dargestellt.

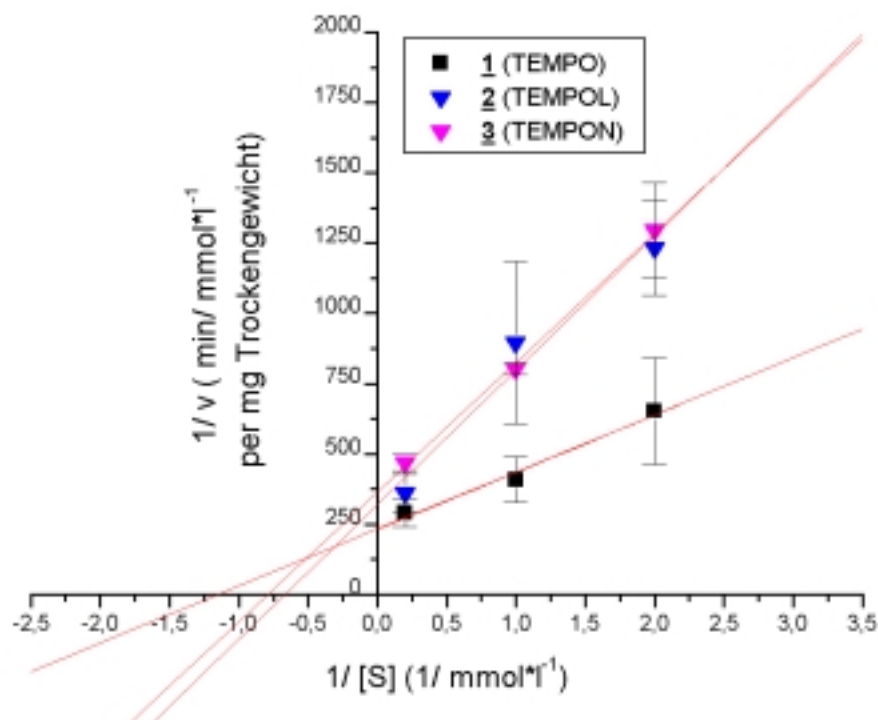


Abbildung 58: Lineweaver-Burk-Plot der initialen Reduktionsgeschwindigkeiten von Nitroxid 1 (TEMPO), 2 (TEMPOL) und 3 (TEMPON) in Abhängigkeit von der eingesetzten Startkonzentration der Nitroxide in Submerskulturen von *Cunninghamella elegans* ATCC 9245.

Aus der obenstehenden Abbildung läßt sich eine Beziehung zwischen dem Reduktionsverhalten und der Lipophilie der Nitroxide erkennen. Während sowohl Nitroxid 2, als auch 3 ähnlich große V_{\max} und K_m -Werte aufweisen, zeigt die wesentlich lipophilere Verbindung 1 eine wesentlich höhere Maximalgeschwindigkeit V_{\max} bei wenig verändertem K_m -Wert. Die relativ großen Standardabweichungen (Variationskoeffizienten von 10- 30%) sind weniger auf die eigentlichen ESR-Messungen, sondern auf die eher ungenaue Quantifizierung mittels Pilztrockengewicht zurückzuführen. Eine Beziehung zwischen den Proteingehalten der Pilzzellen und der Reaktionsgeschwindigkeit wurde absichtlich nicht angeführt, da mit den zur Verfügung stehenden Standardaufschlußverfahren (z.B. mechanischer Aufschluß mit flüssigem Stickstoff/ Seesand) die Pilze nur unvollständig aufgeschlossen wurden. Der gemessene Proteingehalt betrug nur zwischen 5 und 15 % der Pilztrockenmasse. Ein vollständiges und reproduzierbares Aufschließen der sehr widerstandsfähigen Pilzzellen und somit eine exakte Proteinbestimmung konnte mit den vorhandenen Methoden somit nicht sichergestellt werden.

Entgegen bisherigen Annahmen [99], daß die Reduktion von Nitroxylradikalen in Mikroorganismen hauptsächlich über Komponenten der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran vermittelt wird, erbrachten die durchgeführten Untersuchungen an *Cunninghamella*-Kulturen keine Untermauerung dieser Hypothese.

Bei zusätzlich durchgeführten Arbeiten zum Einfluß von verschiedenen selektiven Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette (Antimycin A 100 µg/ ml, Myxothiazol 20 µg/ ml, Cyanid 20 µg/ ml) auf die Geschwindigkeit der Reduktionsreaktion von Nitroxiden in Pilzkulturen konnte kein signifikante Veränderung ($N=5$; $P<0,05$) der V_{\max} und K_m -Werte der Reaktion nachgewiesen werden. Es ist aber auch eine verminderte oder verzögerte Aufnahme von Inhibitoren der Atmungskette in die intakte Pilzzelle denkbar, so daß die effektiv in der Zelle vorhandene Konzentration nicht zur Inhibition ausreichte.

Die Ergebnisse^a von Sauerstoffverbrauchsmessungen von *Cunninghamella*-Kulturen nach Zugabe von Nitroxid **2** deuten darauf hin, daß das paramagnetische Nitroxid in der Atmungskette als Elektronenakzeptor fungiert und nach Übertragung eines Protons als primäres Biotransformationsprodukt das Hydroxylamin gebildet wird. Dies wird durch die Anreicherung von Protonen und damit abnehmenden pH-Wert an der Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran, bedingt durch den Protonengradienten und die negative Ladung an der Oberfläche von Phospholipidschichten, ermöglicht [100].

Die Metabolisierung der Nitroxylradikale zu weiteren Biotransformationsprodukten neben den bekannten Hydroxylaminen wurde über einen Inkubationszeitraum von 144 h untersucht. Obwohl das ESR-Ausgangssignal der Nitroxylradikale mit Kaliumhexacyanoferrat(III), einem gebräuchlichen Reoxidationsmittel für Hydroxylamine, nicht vollständig wiederherstellbar war, konnten keine weiteren Metaboliten identifiziert werden. Die Konzentrationsabnahme an Nitroxylradikalen könnte durch eine irreversible Bindung der Nitroxide bzw. gebildeter Metaboliten an bestimmte Pilzstrukturen oder ein Aufbrechen des Piperidinringes und die Bildung von C2-C6-Körpern durch Biotransformationsprozesse erklärt werden. Diese Frage läßt sich letztendlich nur durch den Einsatz von markierten oder speziellen Sonden (z.B. deuterierte ¹⁵N-Nitroxide) aufklären, da die hier postulierten Bruchstücke sehr klein sind und sich von endogenen Verbindungen der Matrix bisher nicht eindeutig unterscheiden ließen.

^a Bericht zum DFG-Bericht Bo 1350/1-1

6.2 Biotransformation in subzellulären Systemen der Rattenleber

Die Leber spielt als zentrales Stoffwechselorgan eine dominierende Rolle im Rahmen der Biotransformation und Eliminierung von Xenobiotika. Zur Gewährleistung ihrer Funktionen enthält jede Leberparenchymzelle ein breites Spektrum an Enzymen und Isoenzymen. Durch In-vitro-Untersuchungen zur Biotransformation an gereinigten homogenen Leberzellfraktionen (Zytosol, Mikrosomen, Mitochondrien) können neue Erkenntnisse zu Reaktionsmechanismen von Nitroxylradikalen und zum intrazellulären Ort der Metabolisierung gewonnen werden. Die an der Biotransformation beteiligten Enzymsysteme können während der Untersuchung direkt und sehr selektiv beeinflusst (z.B. inhibiert) werden. Allerdings sind bei der Übertragung, der so erreichten Ergebnisse auf den intakten Organismus, Unterschiede in der Geschwindigkeit und im Verlauf der Metabolisierung zu berücksichtigen.

Für die Gewinnung der subzellulären Fraktionen aus Rattenleberhomogenaten wurde im wesentlichen nach Arbeiten von *Kleber et al.* [101] und *Frommer et al.* [102] vorgegangen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Assays von BioRad (modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford mit Coomassie-Blue) bei $\lambda = 595$ nm bestimmt. Diese Farbstoffbindungsmethode bezieht sich auf einen Extinktionskoeffizienten ϵ_{595} von 81 ml/(mg•cm) und weist Nachweisempfindlichkeiten von 1- 15 μ g auf [103]. Um Kreuzkontaminationen mit anderen subzellulären Fraktionen ausschließen zu können und die Qualität der Isolierungsprozesses sicherzustellen, wurden die Aktivitäten der entsprechenden Markerenzyme der einzelnen subzellulären Fraktionen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Relative Enzymaktivitäten [%] der isolierten subzellulären Fraktionen der Rattenleber bezogen auf 100% Aktivität im Rohhomogenat.

subzelluläre Fraktion der Rattenleber	Glucose-6-Phosphatase E.C. 3.1.3.9. -mikrosomal-	Malatenzym E.C. 1.1.1.40. -zytosolisch-	Saure Phosphatase E.C. 3.1.3.2. -lysosomal-	Glutamat-dehydrogenase E.C. 1.4.1.3. -mitochondrial-
Rohhomogenat	100 %	100 %	100 %	100 %
Mitochondrien	8 %	2 %	49 %	61 %
Mikrosomen	88 %	4 %	14 %	8 %
Zytosol	5 %	144 %	23 %	4 %

Die submitochondrialen Partikel (SMP) wurden nach modifizierten Methoden (*Tinberg et al.* [104, 105, 106]) hergestellt. Dabei wurden die SMP durch Digitoninaufschluß (siehe 11.6.1) der äußeren Membran des Mitochondriums und anschließende Ultraschallbehandlung der so gewonnenen Mitoplasten aus Rattenlebermitochondrien isoliert. Für die ESR-Messungen

betrug die Proteinendkonzentration bei allen Experimenten 10 mg/ ml.

6.2.1 Zytosol

Hauptmetabolit der untersuchten Piperidinnitroxide ist das diamagnetische Hydroxylamin. Diese Reaktion scheint im Zytosol überwiegend auf nichtenzymatischen Wege abzulaufen [107], da eine Proteindenaturierung, ausgelöst durch Inkubation der Zytosolfraktion bei 80 °C für 5 min und anschließende Zentrifugation, diese Reduktionsreaktion nur partiell inhibiert.

Als weitere wichtige Metabolisierungsreaktion im Zytosol konnte die Reduktion der Ketofunktion in 4-Position des Piperidinnitroxides **3** zur 4-Hydroxy-Gruppe, und damit die Umwandlung eines Piperidinnitroxides in ein anderes, festgestellt werden (siehe Abbildung 59).

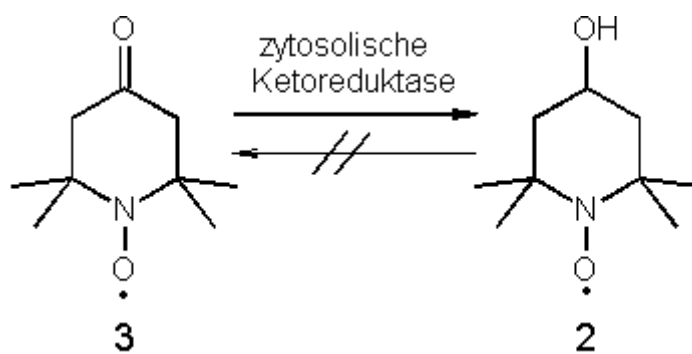
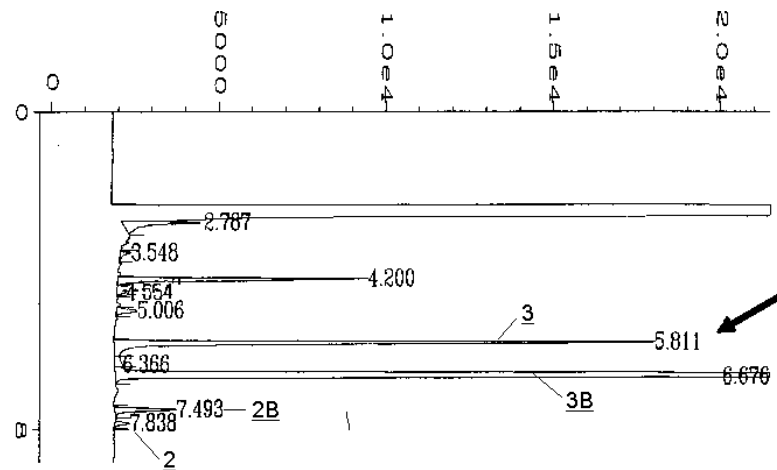


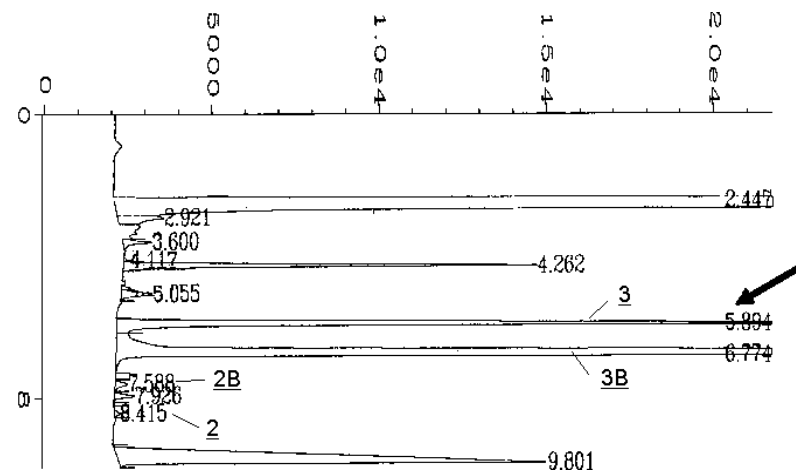
Abbildung 59: Konversion vom 4-Oxo-Derivat TEMPON (**3**) zum 4-Hydroxy-Derivat TEMPOL (**2**) in der aus Rattenleberhomogenat isolierten zytosolischen Fraktion.

Eine durch Oxidoreduktasen vermittelte Oxidation der Hydroxylgruppe wurde nicht festgestellt. Die Ketoreduktion am Piperidinring erfolgt ausschließlich auf enzymatischen Wege. Aufgrund von Veränderungen der Hyperfeinkopplungskonstante im ESR-Spektrum von **3** bei In-vivo-Untersuchungen an Hunden wurde die Reduktion der Ketogruppe des Nitroxides schon seit längerer Zeit von einigen Autoren vermutet, konnte aber nicht eindeutig nachgewiesen werden [108, 109]. Mit den vorliegenden Ergebnissen wurde nun erstmalig der Beweis für diesen Weg der Biotransformation bei Piperidinnitroxiden erbracht und im *Eur. J. Pharm. Sci.* (Vol.8, S. 5- 9, 1999) publiziert. In Mitochondrien- und Mikrosomensuspensionen konnte dagegen keine bzw. eine nur in Spuren erfolgende Reduktion der Ketogruppe von **3** festgestellt werden, die sich im Rahmen der Kreuzkontamination (2-3 %) mit zytosolischen Bestandteilen bewegt (siehe Abbildung 60).

A



B



C

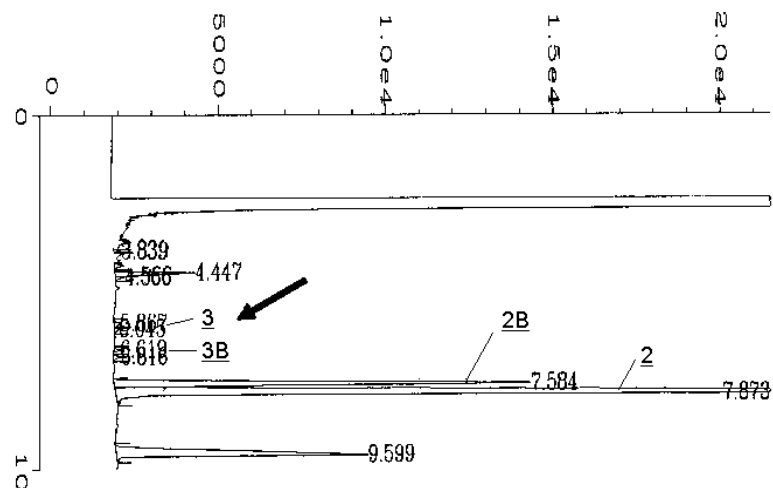


Abbildung 60: GC der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte nach Inkubation (2 h) von Verbindung 3 ($1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) mit (A) Mitochondrien, (B) Mikrosomen und (C) Zytosol isoliert aus Rattenleber unter aeroben Bedingungen.

Die vorgestellten Ergebnisse belegen, daß eine entsprechende Ketoreduktase somit nur im Zytosol der Leberzellen vorhanden ist. Der Einsatz von Quercitrin, einem potenten Ketoreduktaseinhibitor [110, 111], ergab aber keine signifikante Hemmung ($N=10$; $P<0,01$) der Ketoreduktion von Nitroxid 3 im Zytosol. Dies läßt sich auf den ausgeprägten Polymorphismus der Ketoreduktasen zurückführen [112], da Quercitrin nur mit einer begrenzten Anzahl von Isoenzymen dieser Gruppe interagiert. Die Umkehrreaktion, d.h. die Oxidation der 4-Hydroxy-Funktion zur Ketofunktion, konnte in keinem Fall beobachtet werden. Dieser Befund läßt sich auf die sehr kleinen K_m -Werte der enzymatischen Reduktion durch Ketoreduktasen zurückführen.

Weiterhin konnte beim Benzoessäureester 5 die Hydrolysereaktion zu Nitroxid 2 und Benzoessäure im Zytosol festgestellt werden. Es ist anzunehmen, daß zytosolisch gelöste Enzyme für diese Reaktion verantwortlich sind, da eigene Versuche belegten, daß die Denaturierung der Proteinanteile des Zytosols diesen Reaktionschritt vollständig unterbinden. Der Zusatz von Cu^{2+} und Hg^{2+} (Endkonzentration jeweils $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) als Inhibitoren von unspezifischen Esterasen, speziell von Carboxylesterasen, führte zu einer signifikanten Verminderung ($N=10$; $P<0,01$) der Bildung von Verbindung 2 aus 5. Somit können für die Aufspaltung des Esters in Nitroxid 2 und Benzoessäure die im Zytosol von Leberparenchymzellen vorkommenden Carboxylesterasen verantwortlich gemacht werden. Das Reaktions- bzw. Biotransformationsschema von Nitroxid 5 ist in Abbildung 61 dargestellt.

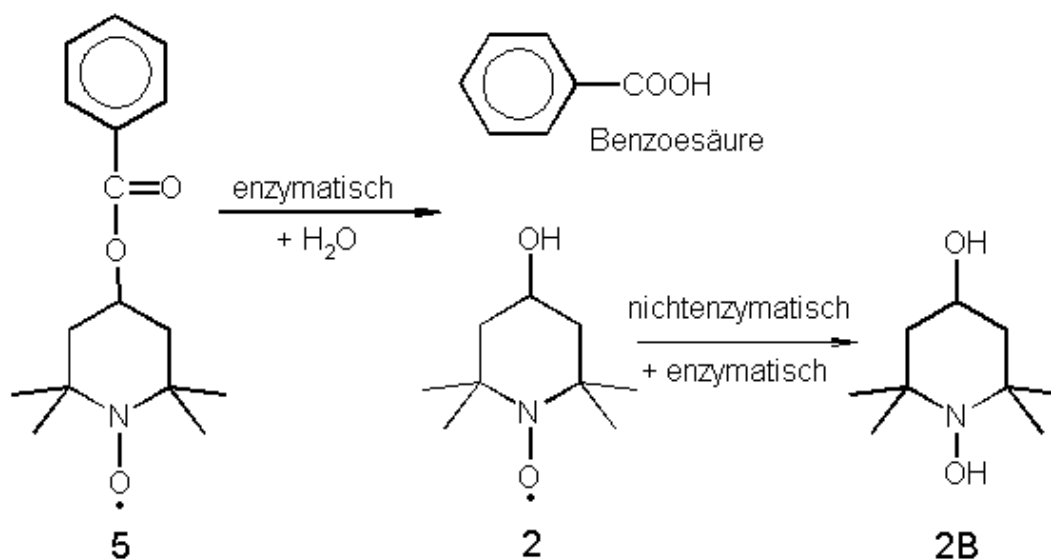


Abbildung 61: Hydrolyse des Esterderivates 5 in der zytosolischen Fraktion gewonnen aus Rattenleberhomogenat. Verantwortlich für die Abspaltung der Benzoessäure sind mit hoher Sicherheit die im Zytosol von Leberparenchymzellen vorkommenden Carboxylesterasen.

6.2.2 Mikrosomen

Im Rahmen der Arbeit wurden Untersuchungen zur Metabolisierung von Nitroxylradikalen und Phase-I-Metaboliten in Mikrosomen der Rattenleber durchgeführt. Der Begriff Mikrosomen für ein subzelluläres System ist als solches nicht völlig exakt, da es sich bei diesen eigentlich um Isolierungsartefakte des Endoplasmatischen Retikulums und Ribosomen mit einem Durchmesser von 20- 200 nm handelt. In den Mikrosomen ist das Cytochrom P-450-System, das wohl wichtigste und vielseitigste fremdstoffmetabolisierende Monooxygenasesystem, lokalisiert [113, 114, 115]. Das Cytochrom P-450 umfaßt eine Vielzahl von Familien und Subfamilien, wobei bisher 12 Genfamilien mit 22 Subfamilien bei Säugetieren beschrieben worden sind [116, 117]. Trotz dieser strukturellen und funktionellen Vielfalt sind alle P-450 Monooxygenasereaktionen durch dasselbe Grundprinzip gekennzeichnet, wonach zunächst Sauerstoff gebunden, die resultierende Verbindung reduktiv gespalten und anschließend ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen wird, wobei Wasser freigesetzt wird [118].

Bei bisherigen Untersuchungen zur Biotransformation von stabilen Nitroxylradikalen in Mikrosomen wurden von anderen Arbeitsgruppen ausschließlich ESR-spektroskopische Methoden eingesetzt und das korrespondierende Hydroxylamin anhand von Reoxidationsexperimenten als Hauptmetabolit festgestellt [119, 120, 121, 122, 123, 124]. Inwieweit das Cytochrom P-450 selbst oder die NADPH-abhängige Cytochrom P-450-Reduktase für die Reduktion der Nitroxylfunktion zum Hydroxylamin verantwortlich ist, wird z.Z. in der Literatur noch kontrovers diskutiert [3].

Der Schwerpunkt der eigenen durchgeführten Arbeiten lag in der Erfassung und Identifizierung von weiteren diamagnetischen Phase-I-Metaboliten. Hierzu wurden Untersuchungen mit isolierten Rattenlebermikrosomen als Enzymquelle durchgeführt. Die verwendeten Mikrosomen wurden durch Ultrazentrifugation gewonnen und nach Isolation innerhalb von 6 h eingesetzt.

In eigenen Untersuchungen konnte bei der Bearbeitung der Piperidinnitroxide neben dem bekannten Hydroxylamin (**B**) auch das sekundäre Amin (**C**) detektiert werden (siehe Abbildung 62).

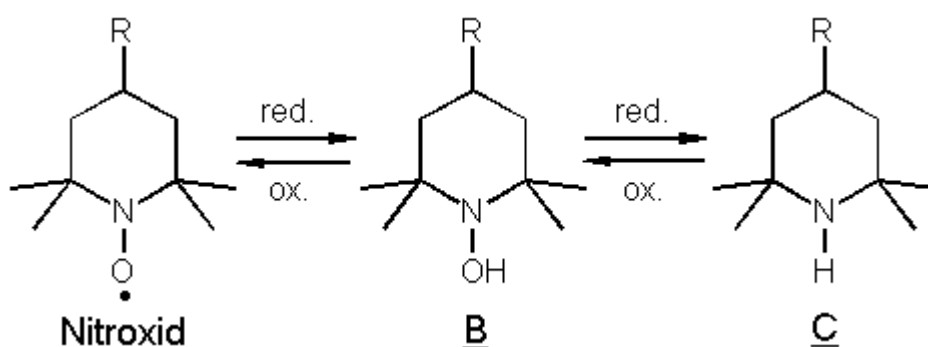


Abbildung 62: Biotransformationschema der Nitroxylfunktion bei Piperidinnitroxiden

Die Konzentration des sekundären Amins ist zwar relativ gering (< 5%), aber signifikant höher ($N=10$; $P<0,05$), als sie in der Ausgangsverbindung als Verunreinigung (normalerweise < 0,1%) enthalten ist. In Kontrollexperimenten wurden sowohl 1B und 1C, als 2B und 2C mit Mikrosomen inkubiert. Bei der Untersuchung der sekundären Amine (C) konnte festgestellt werden, daß diese in Mikrosomen wiederum zum Hydroxylamin (B) bzw. zum Nitroxylradikal oxidiert werden (siehe Abbildung 63). Die Bildung von Artefakten konnte eindeutig ausgeschlossen werden. Nach Hitzedenaturierung der mikrosomalen Proteinkomponenten (5 min 80 °C) wurde auch unter Zusatz des NADPH-regenerierenden Systems keine Oxidation zum Hydroxylamin oder Nitroxylradikal festgestellt.

Dies steht in Übereinstimmung mit Literaturangaben über die In-vitro-Synthese von Nitroxiden aus sterisch gehinderten sekundären Aminen [125] sowie aus anderen Derivaten mit Aminofunktion [126]. Hierbei wurde eine Gleichgewichtskonzentration des Nitroxides festgestellt, was auf ein Gleichgewicht zwischen Oxidation und Reduktion unter aeroben Bedingungen hindeutet [127]. Andere Autoren konnten dagegen keine Oxidation von 1C unter Sauerstoff und NADPH in Mikrosomen ohne und mit Phenobarbitalinduktion feststellen [128]. Als Hauptproblem der bisher publizierten Untersuchungen ist der ausschließliche Einsatz der ESR-Spektroskopie anzusehen. Somit ist keine eindeutige Unterscheidung zwischen dem Hydroxylamin (B) und dem sekundären Amin (C) als diamagnetische Produkte möglich. Anhand der chemischen Struktur erscheint eine Oxidation des sekundären Amins aber plausibel. Somit ist anzunehmen, daß entweder das Hydroxylamin direkt durch Biotransformation gebildet wird oder das entstehende Nitroxylradikal wieder reduziert wird, wenn die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion wesentlich größer ist, als die der primären Phase-I-Reaktion. Im zweiten Fall hätten die entsprechenden Autoren das Nitroxid, trotz metabolischer Bildung, nicht detektieren können.

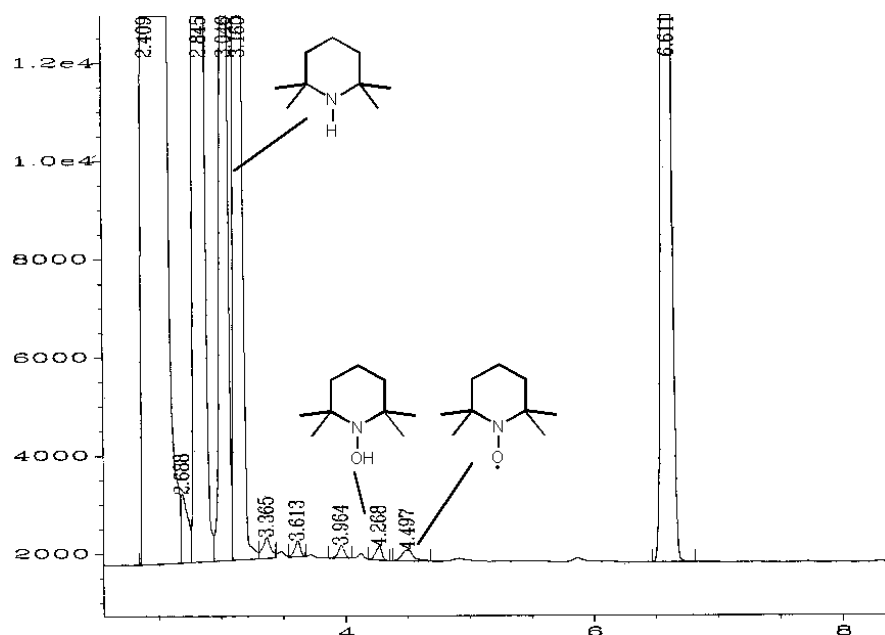


Abbildung 63: Gaschromatogramm eines Extraktes nach Inkubation vom sekundären Amin **1C** (GC t_R = 3,16 min) mit isolierten Rattenlebermikrosomen unter Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems [Inkubationszeit 15 min; Begasung mit Sauerstoff/ Kohlendioxid-Mischung (95/ 5%)].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß anhand der verfügbaren Literatur und den eigenen Untersuchungen ein Redoxzyklus von parallel ablaufenden Oxidations- und Reduktionsreaktionen plausibel erscheint. Inwieweit das Cytochrom P-450 in die Reoxidation des Hydroxylamins involviert ist, bleibt allerdings umstritten, da einige Autoren auch einen, vom Cytochrom P-450 unabhängig verlaufenden Reaktionsweg für bestimmte Amine favorisieren [129]. Andererseits würde dies erklären, warum trotz intensiver Untersuchungen durch andere Arbeitsgruppen an Mikrosomen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie dieser Metabolit bisher nicht gefunden wurde. Untersuchungen zu der Frage inwieweit Sauerstoff die Lage dieses Redoxsystem in Mikrosomen beeinflußt, bleiben weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

6.2.3 Mitochondrien

Bei der Inkubation von Nitroxiden mit isolierten Rattenlebermitochondrien wurde als einziger Metabolit bisher nur das korrespondierende Hydroxylamin festgestellt. Eine Biotransformation des Substituenten in 4-Stellung am Piperidinring erfolgte nicht. Lediglich die Spaltung des Esters **5** in das Nitroxid **2** und die Benzoesäure wurde festgestellt. Diese

Reaktion wird vermutlich durch mitochondriale Esterasen katalysiert, da eine Kreuzkontamination mit anderen subzellulären Bestandteilen durch die gemessenen Aktivitäten der Leitenzyme weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Ein Anteil von 3 - 5 % Mikrosomen an der mitochondrialen Fraktion liegt nach Literaturangaben im Normalbereich [105]. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von Nitroxylradikalen durch Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette (Mitochondrien und submitochondriale Partikel) werden in Kapitel 6.5 vorgestellt und diskutiert.

Bei der Bearbeitung der Mitochondrien bereitet die Probenvorbereitung besondere Schwierigkeiten, da diese über einen sehr hohen Anteil an Membranlipiden und weiteren unpolaren Komponenten verfügen. Damit werden bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der RP-18 SPE eine Vielzahl von endogenen Verbindungen mitextrahiert. Aus diesem Grunde wurde die Headspace-SPME als Probenvorbereitungsmethode der Wahl eingesetzt, bzw. die Inkubationsansätze nach Triton X-100-Zusatz (0,1%) und kurzer Ultraschallbehandlung (30 s bei 25 W) membranfiltriert, mittels direkter SPME extrahiert und anschließend untersucht.

6.3 Biotransformation in der isoliert perfundierten Rattenleber

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden Wistar-Ratten verwendet. Nach Narkotisierung der Ratten mittels Hexobarbital wurde die Leber vollständig entblutet, herauspräpariert und mit den im Perfusionsmedium gelösten Substraten im Kreislaufsystem perfundiert (siehe 11.5.2). Die Probennahme erfolgte nach 0, 5, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min. Danach erfolgte die Identifizierung der Metaboliten durch GC-Cochromatographie der gewonnenen Extrakte mit Referenzsubstanzen, der GC-MS sowie mit Hilfe der ESR nach vorheriger HPLC-Trennung. Zusätzlich wurden mögliche Phase-II-Metaboliten erfaßt.

Als Hauptmetabolit aller untersuchten Piperidinnitroxide wurde das entsprechende Hydroxylamin detektiert. Ein Vergleich der Reaktion unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen erbrachte keine unterschiedlichen Biotransformationsprodukte. Die Konzentration des detektierten sekundären Amins war wesentlich geringer als in isolierten Mikrosomen. Dies könnte auf dessen Anreicherung im lipidreichen Lebergewebe zurückzuführen sein, da nur das Leberperfusat und nicht das perfundierte Lebergewebe extrahiert wurde. Extraktionsversuche aus intakten Lebergewebe waren nicht erfolgreich, da die so gewonnenen Extrakte mit einer Vielzahl von endogenen Produkten kontaminiert waren und damit erreichte Ergebnisse nicht reproduzierbar waren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen für Nitroxid 1 sind im folgendem Biotransformationsschema (siehe Abbildung 64). mit den entsprechenden Ergebnissen der

Quantifizierung dargestellt. Dabei beziehen sich die Prozentangaben auf das initial eingesetzte Nitroxid. Hierbei wurden im Gegensatz zu den Biotransformationsuntersuchungen mit subzellulären Fraktionen erstmals geringe Mengen eines Phase-II-Metaboliten festgestellt. Bei dem nachgewiesenen Essigsäurekonjugat ist anzunehmen, daß die Konjugation erst nach vorheriger Reduktion der Nitroxylgruppe zum sekundären Amin **1C** erfolgt ist.

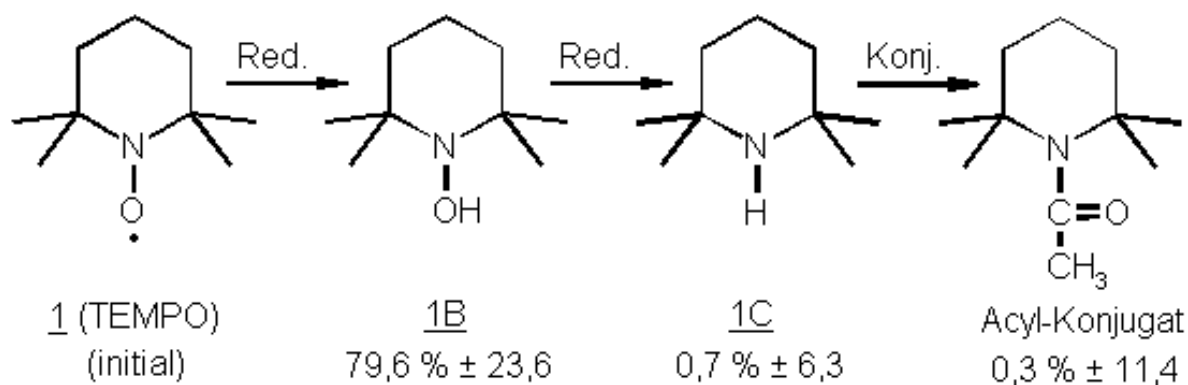


Abbildung 64: Metabolisierungsschema von **1** (100% = 1 mmol·l⁻¹; x ± VK[%]; n = 3). Das Hydroxylamin **1B**, das Amin **1C** und das Acylkonjugat von **1C** wurden detektiert. Die Quantifizierung bezieht sich auf die Inkubation nach 180 min und berücksichtigt die Wiederfindungsraten der Probenvorbereitung.

Ebenfalls interessant war das Biotransformationsverhalten von Nitroxid **3**, da die in Mikrosomen beobachtete Reduktion der Ketofunktion dieser 4-Oxo-Verbindung auch in der isoliert perfundierten Rattenleber festgestellt wurde.

Für die Piperidinnitroxide **2**, **4** und **6** konnte dagegen nur das korrespondierende Hydroxylamin als einziger Metabolit nachgewiesen werden. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen konnte außerdem die Hydrolyse des Benzoesäureesters **5** in der perfundierten Rattenleber festgestellt werden. Neben dem Nitroxylradikal **2** wurde auch die freie Benzoesäure und deren Hauptmetabolit Hippursäure detektiert.

In Abbildung 65 und der zugehörigen Tabelle 30 sind die GC-MS-Ergebnisse der Biotransformationsuntersuchungen von Nitroxid **3** dargestellt.

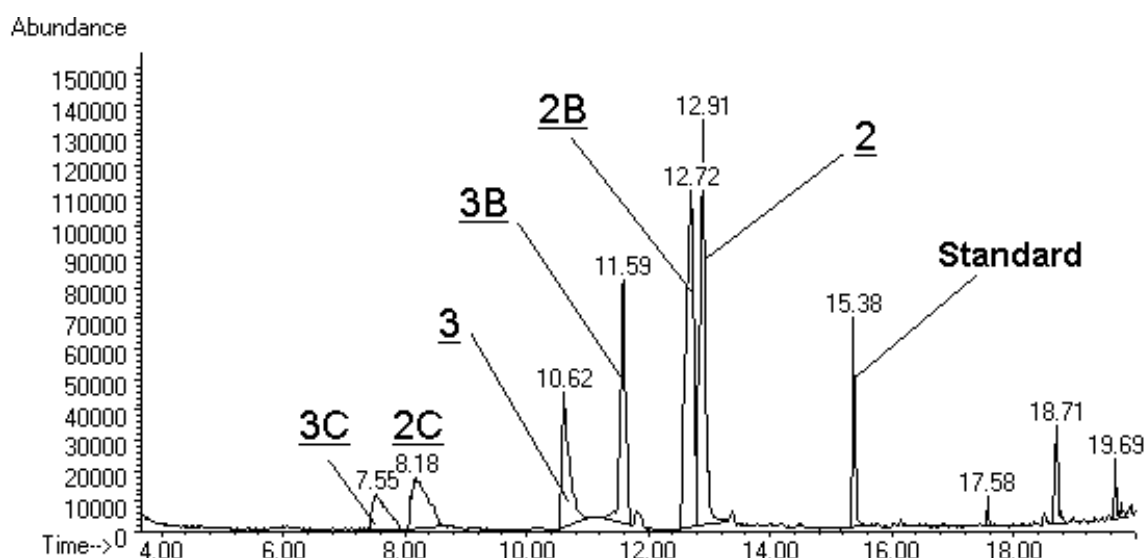


Abbildung 65: GC des Leberperfusates nach Flüssig-Flüssig-Extraktion. Die isoliert perfundierte Rattenleber wurde 3 h mit 100 ml Nitroxid **3** [$1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; isotonischer Phosphatpuffer: pH = 7,4; 37 °C; Begasung mit Sauerstoff/ Kohlendioxid-Mischung (95/ 5%)] perfundiert.

Tabelle 30: Retentionszeiten der GC-Peaks und zugehörige MS-Fragmentierung der Verbindungen nach Perfusion der isoliert perfundierten Rattenleber mit **3** ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

t_R (min)	Charakteristische und intensive MS-Fragmente (Intensität ^{1, 2})	Nr.	Verbindung
7,55	155 (2); 140(3); 141(49); 123(21); 112(4); 98(29); 84(95); 58(69); 55(42); 42(100); 41(45)	3C	4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
8,18	157 (2); 143(5); 142(55); 124(13); 107(9); 99(6); 98(9); 86(17); 85(11); 58(100); 42(39); 41(43)	2C	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
10,62	170 (5); 156(1); 155(1); 140(3); 125(5); 114(11); 98(3); 86(11); 83(9); 57(14); 56(100); 42(89); 41(33)	3	4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
11,59	171 (18); 157(6); 156(71); 140(2); 123(3); 100(76); 83(98); 72(100); 56(19); 55(74); 42(58); 41(74)	3B	1-Hydroxy-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
12,72	173 (14); 159(9); 158(100); 140(35); 108(20); 107(29); 102(94); 98(21); 74(30); 57(55); 56(59); 42(47); 41(79)	2B	1,4-Dihydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin
12,91	172 (12); 158(16); 142(81); 140(8); 124(3); 116(12); 109(8); 98(8); 86(18); 85(30); 71(100); 57(65); 56(21); 42(20); 41(76)	2	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl

¹ In allen Fällen wurden die gleichen Basispeaks wie in den MS der Referenzsubstanzen (siehe hierzu Kapitel 3.1.3) festgestellt und zur Intensitätsbestimmung herangezogen.

² Die Molekülpeaks der Verbindungen sind durch Fettdruck hervorgehoben

Die Quantifizierung der Metaboliten von Nitroxid **3** nach verschiedenen Perfusionszeiten

ergab einen exponentiellen Abfall der initialen Nitroxidkonzentration. Die mittels quantitativer GC bestimmte Halbwertszeit $t_{1/2}$ betrug 70 min. Gleichzeitig nahm die Konzentration von **3B** und **2B** kontinuierlich zu, während die Konzentration von **2** nach 100 min wieder abfiel (siehe Abbildung 66). Nach dreistündiger Perfusion wurden 80,5 µg/ml **2** ($S_{\%}=22,3$, äquivalent 41,3 % der Ausgangsverbindung) und 43,4 µg/ml **2B** ($S_{\%}=15,4$ äquivalent 22,3 % der Ausgangsverbindung).

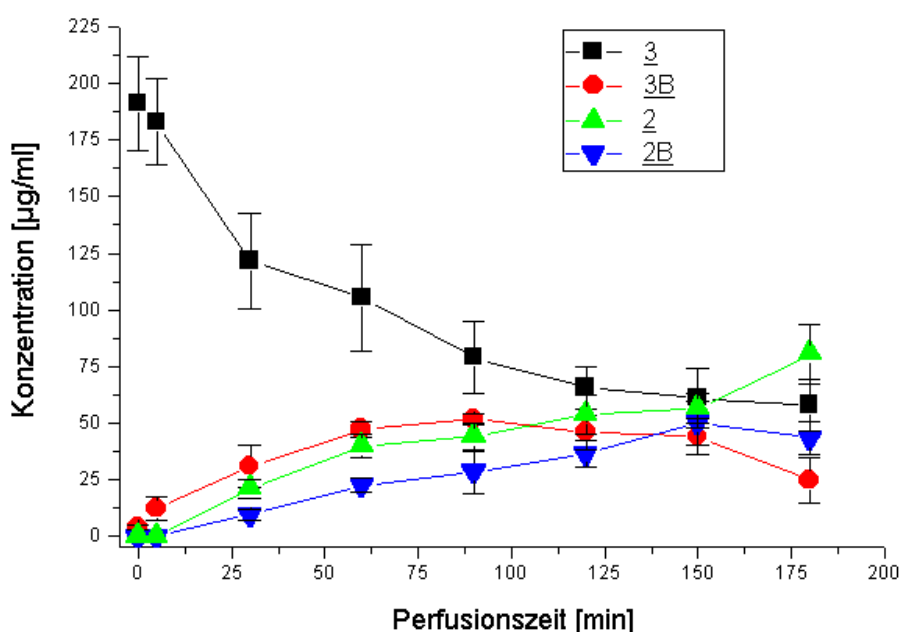


Abbildung 66: Quantifizierung von Ausgangsverbindung **3** und den Metaboliten bzw. Reaktionsprodukten **3B**, **2** und **2B** im Perfusat der isoliert perfundierten Rattenleber nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hilfe von GC und internem Standard ($x \pm S$, $n = 9$).

Die mittels S-Band-ESR-Spektroskopie direkt im Perfusat bestimmte Halbwertszeit $t_{1/2}$ für **3** betrug 47 min. Der verringerte Wert im Gegensatz zur GC-Untersuchung ($t_{1/2}$ 70 min) könnte auf eine partielle Reoxidation der Nitroxide während der Extraktion zurückzuführen sein (siehe Abbildung 67).

Der Einsatz von Metyrapon ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und SKF 525A (Proadifen: $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) als effektive Cytochrom P-450-Inhibitoren und von N-Ethylmaleimid (Endkonz. $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) als Thiolgruppenblocker hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Reduktion der Nitroxylfunktion in der isoliert perfundierten Rattenleber, d.h. diese Enzymsysteme sind offensichtlich an der Biotransformation in der isoliert perfundierten Rattenleber nicht oder nicht signifikant beteiligt.

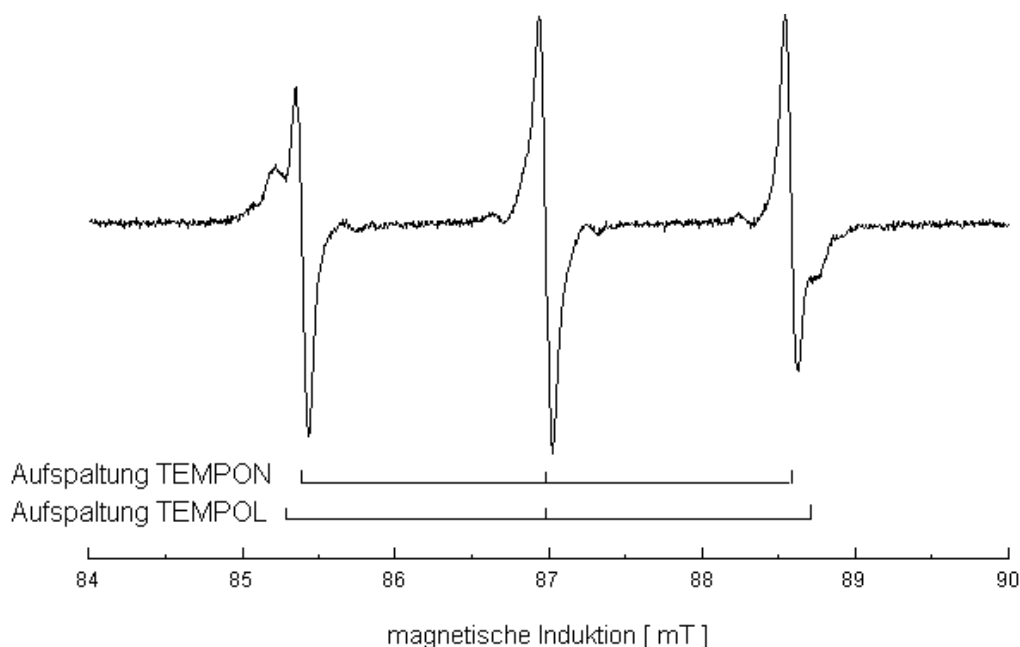


Abbildung 67: S-Band-ESR-Spektrum des Extraktes nach Flüssig-Flüssig-Extraktion der Perfusates (nach Rattenleberperfusion mit Nitroxid **3**; $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; Perfusionsdauer 3 h).

In dem folgenden Schema (siehe Abbildung 68) sind die Ergebnisse der Biotransformationsuntersuchungen von Nitroxylradikal **3** in der isolierten perfundierten Rattenleber schematisch dargestellt.

Neben der Ausgangsverbindung **3** und dem korrespondierendem Hydroxylamin wurden 4 weitere Verbindungen detektiert, wobei das Hydroxylamin **2B** und das Nitroxid **2** mengenmäßig am bedeutsamsten waren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind **2** und **2B**, als Hauptmetaboliten der hepatischen Biotransformation von **3**, die Reaktionsprodukte der parallel ablaufenden Ketoreduktion in 4-Position und der Reduktion in 1-Position am Piperidinring.

Die Biotransformation des Pyrroldinitroxides **9** und der Imidazolderivate **11**, **12** und **13** in der isoliert perfundierten Rattenleber führt ausschließlich zu den entsprechenden diamagnetischen Hydroxylaminen. Die Reduktion zu sekundären Aminen oder weitere Veränderungen an Substituenten konnten nicht nachgewiesen werden.

Mit Ausnahme des Acetylkongjugates konnten ebenfalls keine weiteren Hinweise auf die Bildung von Glucuronid- und Sulfatkongjugaten aus Nitroxiden mit Piperidin-, Pyrrol- und

Imidazolgrundstruktur oder deren Phase-I-Metaboliten erhalten werden. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu einem Literaturbefund, in dem Glucuronide von **2** nach Rattenleberperfusion festgestellt wurden [130]. Eine genaue Beschreibung des verwendeten Versuchsbedingungen konnte jedoch von der entsprechenden Arbeitsgruppe nicht erhalten werden, so daß diese divergierenden Befunde hier nicht abschließend diskutiert werden können.

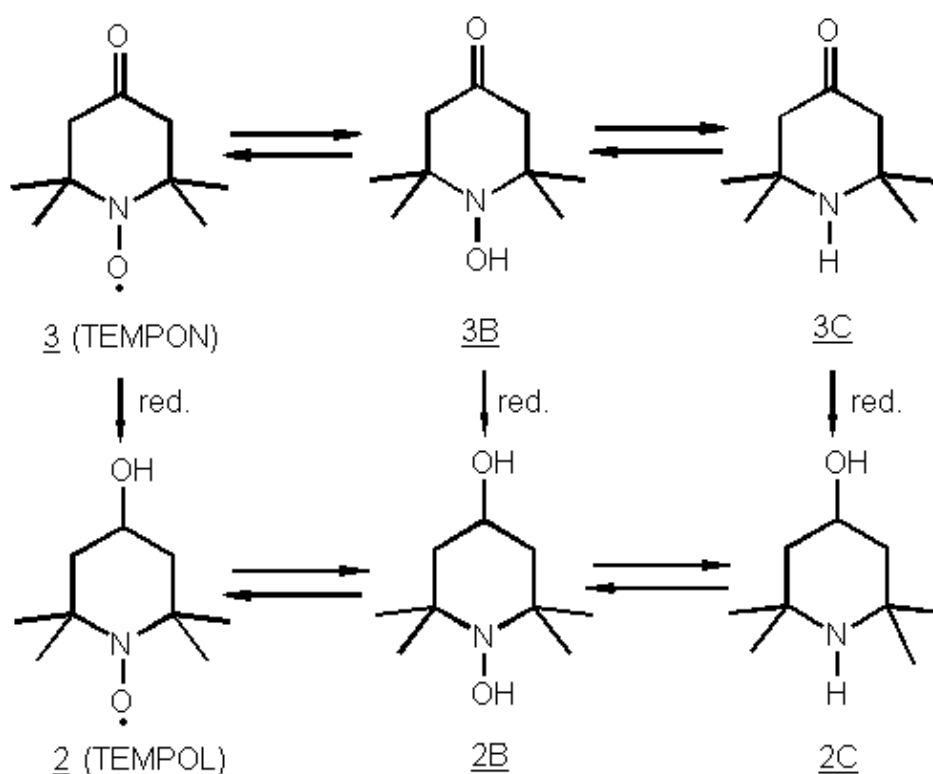


Abbildung 68: Phase-I-Biotransformationsschema von Piperidinnitroxid **3** (TEMPON) in der isoliert perfundierten Rattenleber. Die Konzentration der gebildeten Amine bleibt gering, da gleichzeitig eine Reoxidation im endoplasmatischen Retikulum stattfindet.

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse läßt sich feststellen, daß die diamagnetischen Hydroxylamine die Hauptprodukte der hepatischen Biotransformation der untersuchten Nitroxylradikale darstellen. Bei den Piperidinnitroxiden treten, im Gegensatz zu den anderen Verbindungen, zusätzlich weitere Metabolite nach Reduktion der Hydroxylamine, Veränderungen der Substituenten in 4-Position und Konjugation mit Acetylgruppen auf.

6.4 Biotransformation in der humanen Keratinozytenzellkultur HaCaT

Die Haut hat als äußere Grenzfläche des Organismus eine besondere Bedeutung für Resorption und Biotransformation von Xenobiotika. Zwar sind die Aktivitäten der Biotransformationsenzyme in der Haut deutlich geringer als in der Leber [131], jedoch verfügen die Keratinozyten über ein komplexes System von enzymatischen und nichtenzymatischen Komponenten zur Eliminierung von Radikalen. Dies gilt besonders für kurzlebige reaktive Sauerstoffspezies [132]. Demzufolge sind die untersuchten Nitroxylradikale geeignete potentielle Substrate für diese Scavengerfunktion der Keratinozyten [133]. Die Aufklärung des "*metabolic pathway*" von Nitroxiden in der Haut ist von besonderer Bedeutung, da der Einsatz dieser Verbindungen für biopharmazeutisch und pharmazeutisch-technologische Fragestellungen von wachsender Bedeutung ist.

6.4.1 Identifizierung von Metaboliten

Es gibt in der Literatur Hinweise darüber, daß die Nitroxylradikale in Keratinozyten zu den korrespondierenden Hydroxylaminen aber auch zu den entsprechenden sterisch gehinderten sekundären Aminen reduziert werden [134, 135]. Die Ergebnisse und Schlußfolgerungen dieser Arbeiten werden jedoch in der Literatur sehr kontrovers diskutiert [3, 136], da Interpretationen von Biotransformationsprodukten und Mechanismen der Metabolisierung auf der alleinigen Grundlage von ESR-Untersuchungen [137], grundsätzlich sehr kritisch zu beurteilen sind. Weiterhin ist die häufige Verwendung von „Hauthomogenaten“ (normalerweise unter Verwendung eines Ultra-Turrax aus präparierter Haut gewonnen) für Metabolisierungsstudien mit Nitroxylradikalen [138] problematisch, weil dabei subzelluläre Strukturen der Zelle zerstört werden und damit gleichzeitig Enzyme und Übergangsmetalle unkontrolliert freigesetzt werden.

Aus diesem Grunde wurde für die durchgeführten Untersuchungen die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (von Prof. Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) verwendet. Eine Homogenisierung kann deshalb entfallen. Diese humane Keratinozytenzelllinie ist eine spontan transformierte humane Zelllinie mit typischer epithelialer Zellmorphologie [139, 140, 141, 142]. Sie besitzt gegenüber normalen Keratinozyten eine erhöhte Proliferationsrate und verfügt über die für Biotransformationsreaktionen relevanten Enzymaktivitäten [143]. Die HaCaT-Zellen wurden in Plastikpetrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm [Inkubationstemperatur 37°C; Begasung mit Sauerstoff/ Kohlendioxid-Mischung (95/ 5%)]. 3- 4 Tage nach der letzten Passage wurde das Medium erneuert und die Zellen mit dem frischen Medium solange weiterinkubiert, bis sie zu einem geschlossenen "Monolayer" ausgewachsen waren.

Der Zellkultur wurden anschließend definierte Mengen an Untersuchungssubstanz zugesetzt. Nach verschiedenen Umsetzungszeiten wurde der Versuch abgebrochen. Anschließend wurden Kulturmedium und HaCaT-Zellen mechanisch aufgeschlossen und das Homogenat für die Erfassung von gebildeten Metaboliten mit Hilfe der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Extrelut®-Säulen) extrahiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der so gewonnenen Extrakte mittels chromatographischer und spektroskopischer Methoden. Für die gaschromatographische Quantifizierungen wurden aus dem Homogenat geringe Probenmengen entnommen, der jeweilige interne Standard entsprechend zudosiert und mittels SPME bzw. Headspace-SPME extrahiert.

Die Ergebnisse sind für Nitroxid **1** (TEMPO) in Abbildung 69 dargestellt.

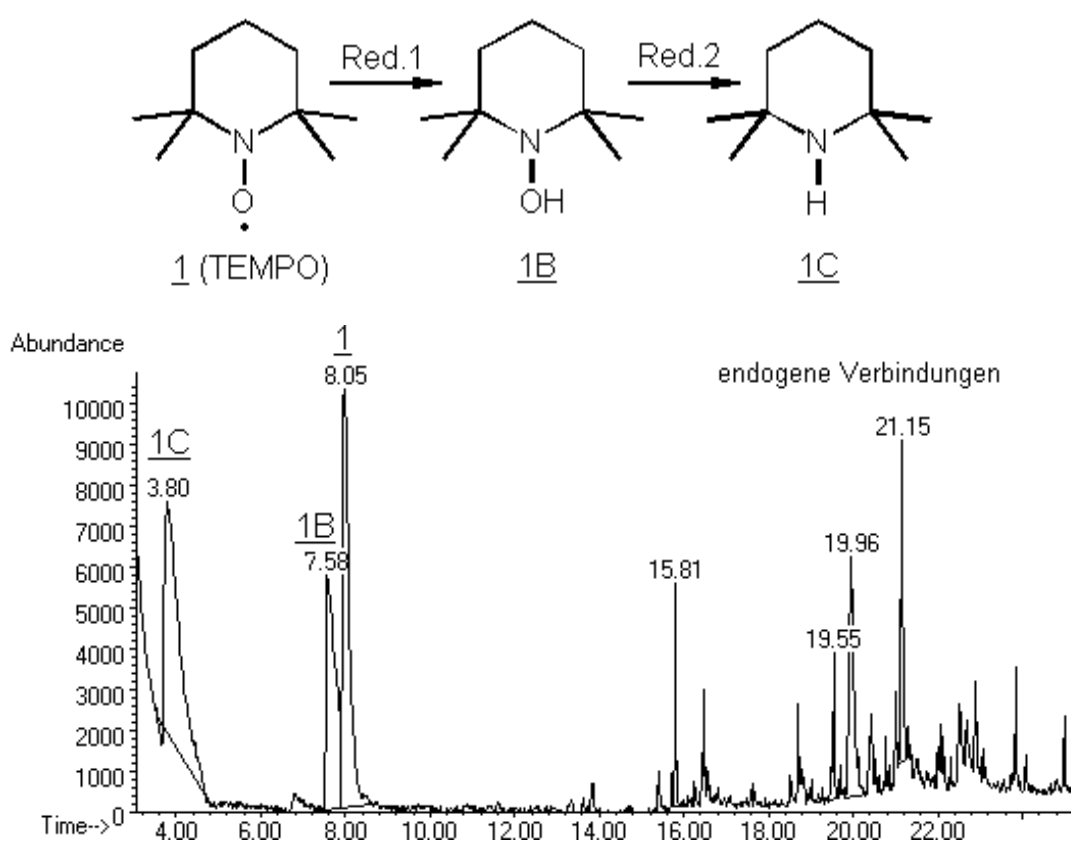


Abbildung 69: Gaschromatogramm des Extraktes nach Inkubation von **1** und Biotransformationschema von **1** in der Keratinozytenzellkultur HaCaT mit der Bildung des diamagnetischen Hydroxylamins **1B** (Reduktionsreaktion 1) und des sekundären Amins **1C** (Reduktionsreaktion 2).

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eine Reduktion der Piperidinnitroxide zu den korrespondierenden Hydroxylaminen (Reduktionsschritt 1 in Abbildung 69) und in einem weiteren Reaktionsschritt (Reduktionreaktion 2 in Abbildung 69) zu den sekundären Aminen

festgestellt werden. Die Reduktionreaktion vom paramagnetischen Nitroxylradikal zu diamagnetischen Reaktionsprodukten bzw. Metaboliten läuft in Keratinocyten relativ schnell ab und ist durch N-Ethylmaleimid (NEM), einem potenten Thiolgruppenblocker, partiell hemmbar. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit bereits publizierten ESR-Untersuchungen zum Metabolismus, die unter Verwendung von humanen Hauthomogenaten durchgeführt wurden [144].

Die Abbildung 70 zeigt die charakteristische Abnahme der ESR-Signalamplitude von Nitroxid 1 (Startkonzentration $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nach Inkubation mit einer Zellsuspension von humanen Keratinocyten (HaCaT-Zellen; $2\cdot 10^6$ Zellen/ ml).

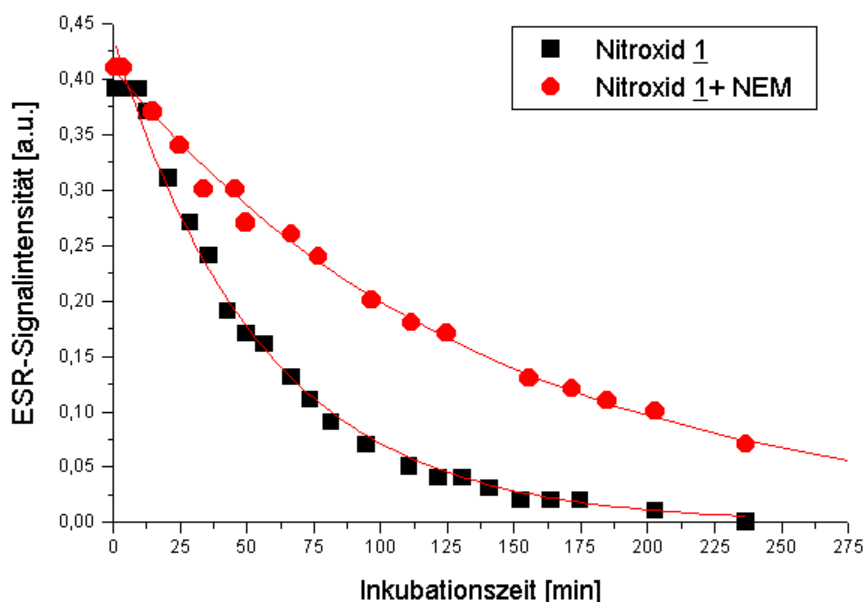


Abbildung 70: Reduktion von Nitroxylradikal 1 gemessen als Abnahme der ESR-Signalintensität (Ausgangskonzentration $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in einer HaCaT-Zellsuspension ($2\cdot 10^6$ Zellen/ ml) unter aeroben Bedingungen.

Durch die partielle Hemmung der Reduktion von Nitroxiden mit NEM wird nachgewiesen, daß neben nichtenzymatischen Komponenten auch unterschiedliche Enzymsysteme an dieser Reaktion in Keratinocyten beteiligt sein. So wird die Beteiligung der Thio-redoxinreduktase (EC 1.6.4.5), der Glutathionreduktase und weiterer thiolabhängiger Enzymsysteme an der Biotransformation von Nitroxiden diskutiert.

6.4.2 Bildung des sekundären Amins in Keratinozyten

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte die Biotransformation zu den sterisch gehinderten sekundären Aminen aus den Piperidinnitroxiden **1**, **2** und **3** nachgewiesen werden, während bei weiteren untersuchten Piperidinitroxiden (**4**, **6**, **8**) kein Amin detektiert wurde. Die Identifizierung der Metabolite erfolgte mittels GC-MS und ¹H-NMR-Methoden. Die MS-Fragmentierungen der gebildeten sekundäre Amine **2C** und **3C** sind in den Tabellen 31 und 32 dargestellt. Durch den Vergleich mit den MS der Referenzsubstanzen (siehe hierzu 3.1.3) konnten diese Verbindungen eindeutig identifiziert und zusätzlich der Mechanismus ihrer MS-Fragmentierung dargestellt werden. Die gemessene MS-Fragmentierung von Metabolit **1C** entsprach der Referenzsubstanz **1C** und ist deshalb nicht extra dargestellt.

Die Reduktion von Piperidinnitroxiden zu den Hydroxylaminen erfolgt innerhalb von Minuten, während die Bildung des sekundären Amins relativ langsam abläuft, d.h. die Konzentration nimmt erst im Verlauf mehrerer Tage kontinuierlich zu. Eine besondere Problematik bildet hier die Kontamination der Untersuchungssubstanzen mit den sekundären Aminen und Hydroxylaminen, so daß in jedem Fall eine exakte Quantifizierung mittels internem Standard durchgeführt werden muß.

Während der Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß das Ausmaß der Reduktion zum Amin von der Lipophilie der eingesetzten Nitroxide abhängt (siehe Abbildung 71). So wird das unsubstituierte Piperidinnitroxid **1** ($P_{\text{Octanol/Wasser}} = 63$) innerhalb von 5 Tagen partiell (21 % der Ausgangskonzentration von **1**) zum sekundären Amin **1C** reduziert, während das wesentlich hydrophilere 4-Amino-Derivat **4** ($P_{\text{Octanol/Wasser}} = 0,1$) in diesem Zeitraum ausschließlich zum korrespondierenden Hydroxylamin reduziert wird. Die Nitroxide **2** ($P_{\text{Octanol/Wasser}} = 3,7$) und **3** ($P_{\text{Octanol/Wasser}} = 1,6$) zeigen ebenfalls eine geringe Bildung des sekundären Amins im Vergleich zu **1**.

Tabelle 31: MS von Metabolit **2C** (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin).

m/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
157	1	M	C ₉ H ₁₉ NO
143	6	M - [•] CH ₃ + 1, Isotopenpeak	
142	59	M - [•] CH ₃ , a ₃	C ₈ H ₁₆ NO
125	1	M - ([•] CH ₃ + NH ₃), a ₄	C ₈ H ₁₃ O
124	12		
108	3		
107	7		
100	1	M - C ₃ H ₆ NH, a ₆	C ₆ H ₁₂ O
99	5	M - ([•] C ₃ H ₅ O + H [•]), a ₂ M - C ₃ H ₆ O, a ₂	C ₆ H ₁₃ NO
98	7	M - ([•] C ₃ H ₅ O + H [•] + H [•]), a ₂	C ₆ H ₁₂ NO

In-vitro-Biotransformation von Nitroxylradikalen

		M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_4\text{O}$), b ₅	
86	18	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_4\text{H}_8$), a ₃	C ₄ H ₈ NO
85	10	M - (C ₃ H ₆ NH + $\cdot\text{CH}_3$), a ₆	C ₅ H ₉ O
72	3	M - (C ₃ H ₆ NH + C ₂ H ₄), a ₆	C ₄ H ₈ O
58	100	M - C ₆ H ₁₁ O, a ₂	C ₃ H ₈ N
42	42		
41	34	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_4\text{O} + \text{C}_3\text{H}_6\text{NH}$), b ₅	C ₃ H ₅

¹ m/z 58= 100%

Tabelle 32: MS von Metabolit **3C** (4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin).

m/z	Relative Intensität ¹ [%]	Fragmentierungsweg / Ionenart	Summenformel
155	3	M	C ₉ H ₁₇ NO
141	5	M - $\cdot\text{CH}_3 + 1$, Isotopenpeak	
140	55	M - $\cdot\text{CH}_3$, a ₃	C ₈ H ₁₄ NO
123	20	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{NH}_3$), a ₄	C ₈ H ₁₁ O
112	4		
105	1		
98	5	M - C ₃ H ₆ NH, a ₆ M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$) b ₅	C ₆ H ₁₀ O C ₆ H ₁₂ N
84	26	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_4\text{H}_8$) a ₃	C ₄ H ₆ NO
83	91	M - (C ₃ H ₆ NH + $\cdot\text{CH}_3$), a ₆	C ₅ H ₇ O
67	6		
58	64	M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{C}_3\text{H}_4$) b ₅	C ₃ H ₈ N
56	20	M - (C ₃ H ₆ NH + C ₂ H ₃ O), a ₆	C ₄ H ₈
55	39		
53	12		
43	31		
42	100	M - (C ₃ H ₆ NH + C ₃ H ₄ O), a ₆ M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_4\text{H}_8 + \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$); e ₂	C ₃ H ₆ C ₂ H ₄ N
41	42	M - (C ₃ H ₆ NH + C ₃ H ₅ O), a ₆ M - ($\cdot\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{C}_3\text{H}_6\text{NH}$) b ₅	C ₃ H ₅

¹ m/z 42= 100%

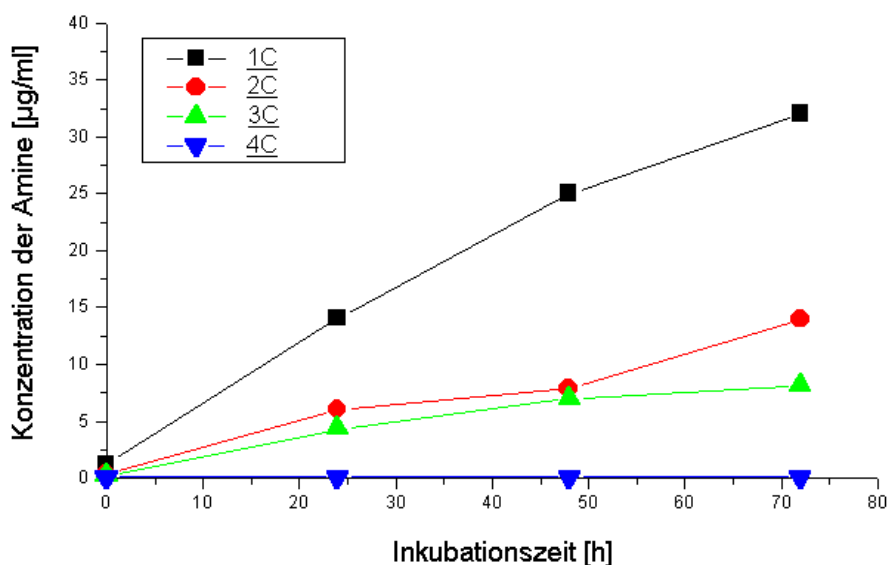


Abbildung 71: Bildung der sekundären Amine aus Piperidinnitroxiden in HaCaT-Zellen. Initialkonzentration der Nitroxide $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 1 (TEMPO) $156 \text{ } \mu\text{g/ml}$, 2 (TEMPOL) $172 \text{ } \mu\text{g/ml}$, 3 (TEMPON) $170 \text{ } \mu\text{g/ml}$, 4 (4-Amino-TEMPO) $171 \text{ } \mu\text{g/ml}$; Analyten in DMSO gelöst, DMSO-Anteil bei der Inkubation maximal 0,1 %].

Bei eigenen Untersuchungen zur Reoxidation von sekundären Aminen, wie 1C, 2C und 4C konnten keine entsprechenden Hydroxylamine oder Nitroxylradikale festgestellt werden. Ein Redoxzyklus der Nitroxylradikalfunktion, der das sekundäre Amin einschließt, ist somit in Keratinozyten nicht anzunehmen. Die Bildung von Konjugaten aus Nitroxiden bzw. deren Reaktionsprodukten als Phase-II-Metabolite konnte in Keratinozyten nicht festgestellt werden, obwohl die Kapazität der Haut zur Bildung von Glucuroniden schon lange bekannt ist [145, 146] und die verwendeten HaCaT-Zellen über ein entsprechendes Enzymmuster verfügen [147].

Im Rahmen der Untersuchungen zur Biotransformation von Nitroxiden mit Pyrrolidin-, Imidazolin- und Imidazolidinstruktur (5-Ringstruktur) in humanen Keratinozyten konnte im Gegensatz zu den Piperidinnitroxiden keine Reduktion zu den sekundären Aminen und nur eine geringe Bildung der korrespondierenden Hydroxylamine festgestellt werden (siehe Abbildung 72). Das unterschiedliche Reaktionsverhalten dieser Nitroxide im Gegensatz zu den Piperidinnitroxylradikalen, könnte möglicherweise auf die allgemein geringere Lipophilie der Verbindungen zurückzuführen sein. Nitroxide mit Imidazolin-, Imidazolidin- und Pyrrolidinstruktur (5-Ringstruktur) bilden somit in biologischen Systemen keine sekundären

Amine wie die vergleichbaren Piperidinderivate.

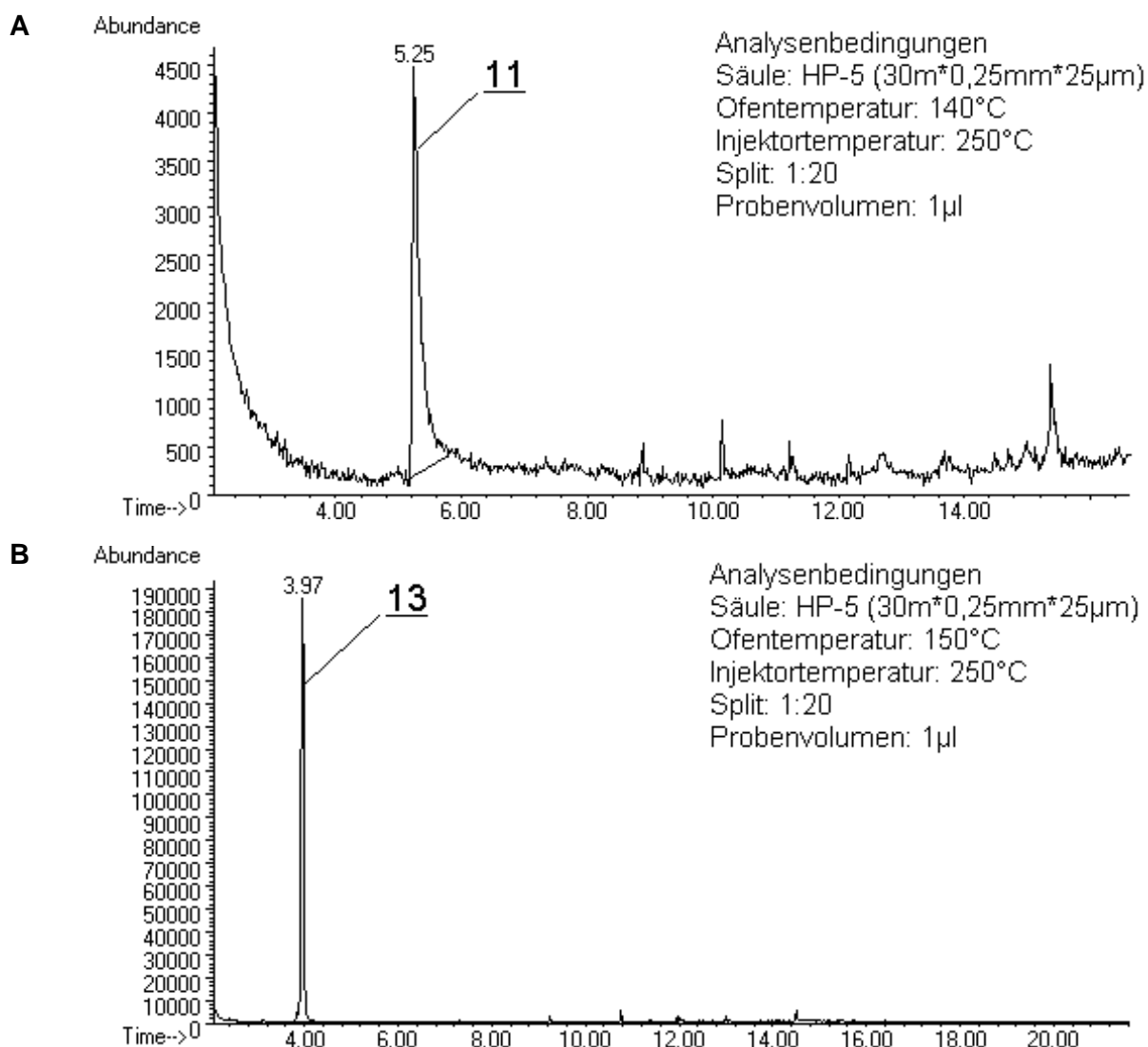


Abbildung 72: Gaschromatogramme der erhaltenen Extrakte nach Inkubation eines Imidazolin- **11** (A) bzw. eines Imidazolidinnitroxides **13** (B) (Konz.: 400 µmol·l⁻¹) mit einer HaCaT-Zellkultur; Inkubationszeit 24 h. Die korrespondierenden Hydroxylamine sind nur in Spuren und die sekundären Amine nicht nachweisbar.

6.4.3 Einfluß von Inhibitoren und Mechanismen der Metabolisierung

Die Keratinozyten verfügen als wesentliche zelluläre Bestandteile der Haut über ein komplexes enzymatisches System zur Biotransformation von Xenobiotika. Für die Metabolisierung von Nitroxylradikalen in der Haut sind sowohl enzymatische Mechanismen (Thioredoxinreduktase, Glutathionreduktase-Glutathionperoxidase und Cytochrom P-450), als auch die Beteiligung nichtenzymatischer Komponenten (Ascorbinsäure, Glutathion, Tocopherol) bzw. deren Kombination (Ascorbinsäure-Glutathion-Redoxzyklus) in der

Diskussion [148]. Die bisher zu dieser Problematik publizierten Ergebnisse und Interpretationen divergieren sehr stark. Übereinstimmung herrscht aber bei der Annahme, daß das Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-System und der Ascorbinsäure-Glutathion-Redoxzyklus am bedeutsamsten sind.

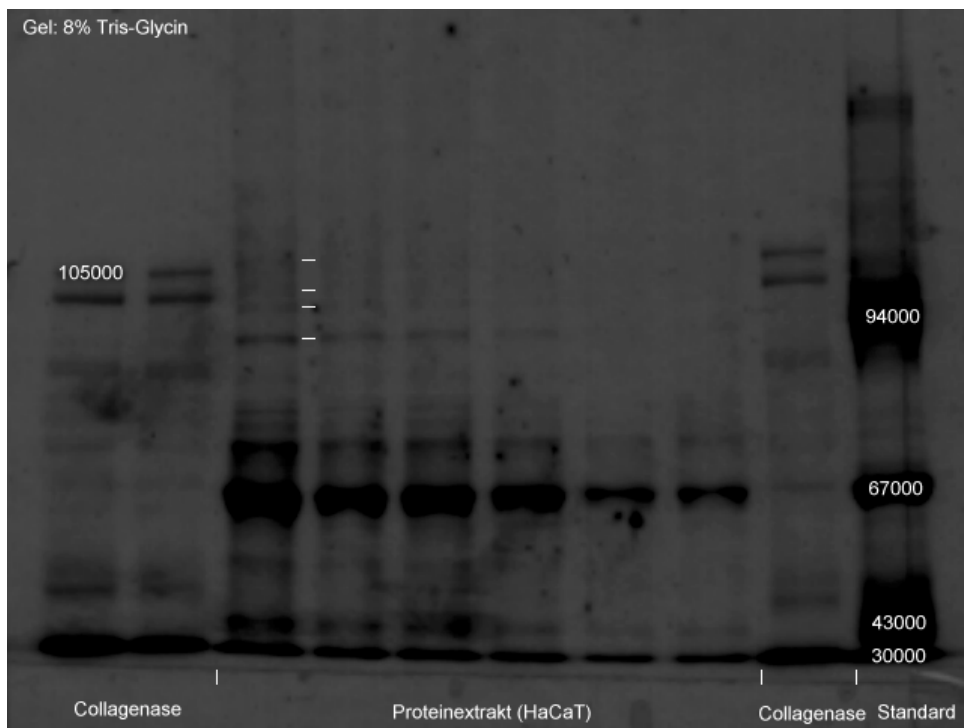
Die Thioredoxinreduktase (EC 1.6.4.5) der Säugerzelle besteht aus zwei Untereinheiten ($M_r = 58$ kDa) mit einem „nativen“ Gewicht von 116 kDa, ist hochspezifisch für NADPH, enthält FAD als prosthetische Gruppe und ist mit Arsenit hemmbar [149]. Das Enzym ist in verschiedenen Zellkompartimenten, wie dem granulären Endoplasmatischen Reticulum, den Golgivesikeln, im Zytosol und im Chromatin des Nucleus nachweisbar [150]. Das entsprechende Substrat Thioredoxin hat ein Molekulargewicht von 12000 und besteht aus 110 Aminosäuren mit einem NH_2 -terminalen Valinrest.

Zur sicheren Untersuchung der Mechanismen der Metabolisierung von Nitroxylradikalen in Keratinozytenzellkulturen wurde geprüft, inwieweit die Thioredoxinreduktase in HaCaT-Zellen nachweisbar ist.

Dazu wurden HaCaT-Zellen mittels Ultraschallstab aufgeschlossen, Zellkerne und Bruchstücke abzentrifugiert, niedermolekulare Verbindungen durch Dialyse abgetrennt und das gewonnene Dialysat nach *Holmgren et al.* [151] weiter aufgearbeitet. Der Probe wurde mittels Gelelektrophorese unter Verwendung verschiedener Tris-Glycin-Mischungen untersucht. Entsprechende Proteinstandards mit definierten Molmassen wurden mitgeführt. Als Ergebnis dieser Untersuchungen (siehe Abbildung 73) konnte nachgewiesen werden, daß in den Proteinextrakten der HaCaT-Zellen sowohl Fraktionen mit $M_r = 55$ - 60 kDa als auch mit $M_r = 110$ - 120 kDa vorhanden waren, die auf ein Vorhandensein der Thioredoxinreduktase in diesen Zellen hindeuten.

Zusätzlich wurde der DTNB-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität durchgeführt. Der DTNB-Assay beruht auf der Reduktion von DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) zu gelb gefärbter 5'-Thionitrobenzoesäure ($\lambda_{\text{max}} = 412$; Extinktionskoeffizient $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) durch Thioredoxinreduktase/ NADPH [152, 153]. Es ist aber im Vergleich mit Literaturangaben anzumerken, daß das Enzym aufgrund der begrenzten Masse an biologischem Material nicht isoliert werden konnte (für Isolierung ≥ 50 g Probe). Bei den untersuchten Proben betrug die Aktivität von 1 mg Probe 30-80 Units, wobei 1 Unit gleich 1 μmol gebildete 5'-Thionitrobenzoesäure entspricht ($1 \text{ U} = \Delta E_{412} \text{ pro min} / 27,2$). Als Vergleich: die Aktivität von 1 mg isolierter Thioredoxinreduktase betrug bei *Holmgren et al.* [152] 1200.

A



B

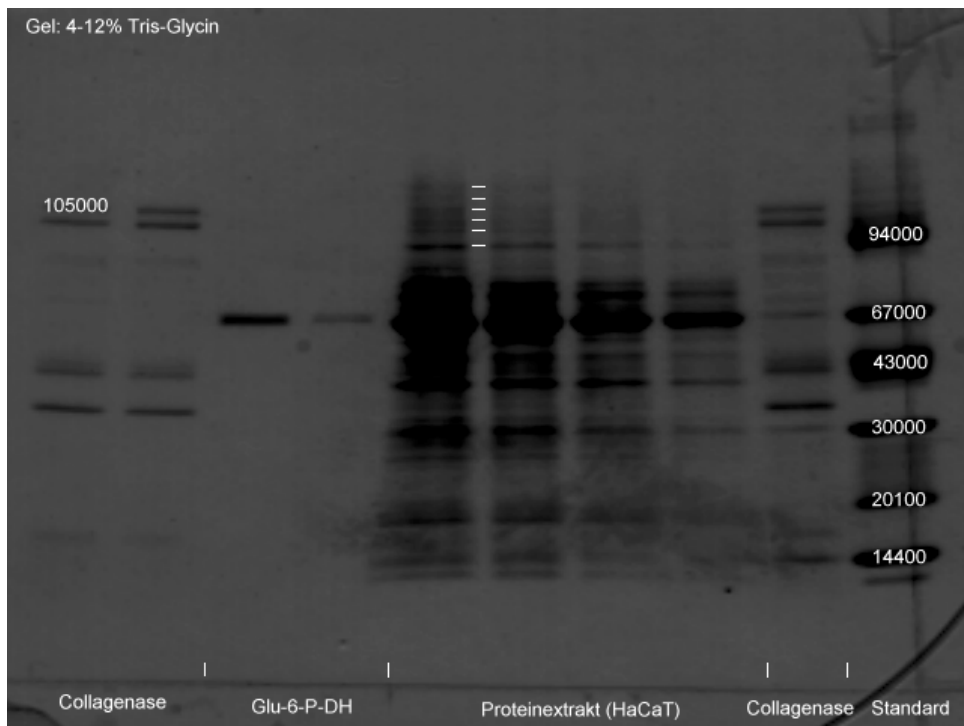


Abbildung 73: Elektrophorese von HaCaT-Proteinextrakten auf Tris-Glycin-Gelen.

Aus den elektrophoretischen Untersuchungen und den Ergebnissen des DTNB-Assay läßt sich schlußfolgern, daß die verwendeten HaCaT-Zellen mit hoher Sicherheit über das Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-System verfügen.

Für die durchgeführten Hemmversuche zur Biotransformation von Nitroxiden wurden folgende Inhibitoren verwendet: NEM (N-Ethylmaleimid) als Thiolgruppenblocker, Azelainsäure als kompetitiver Inhibitor und 2,6-Dichloroindophenol sowie 2-Chlor-2,4-dinitrobenzen als irreversible Inhibitoren der humanen Thioredoxinreduktase. Metyrapon wurde als relativ unspezifischer Inhibitor einer Vielzahl von Isoenzymen des Cytochrom P-450 eingesetzt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind graphisch in Abbildung 74 dargestellt.

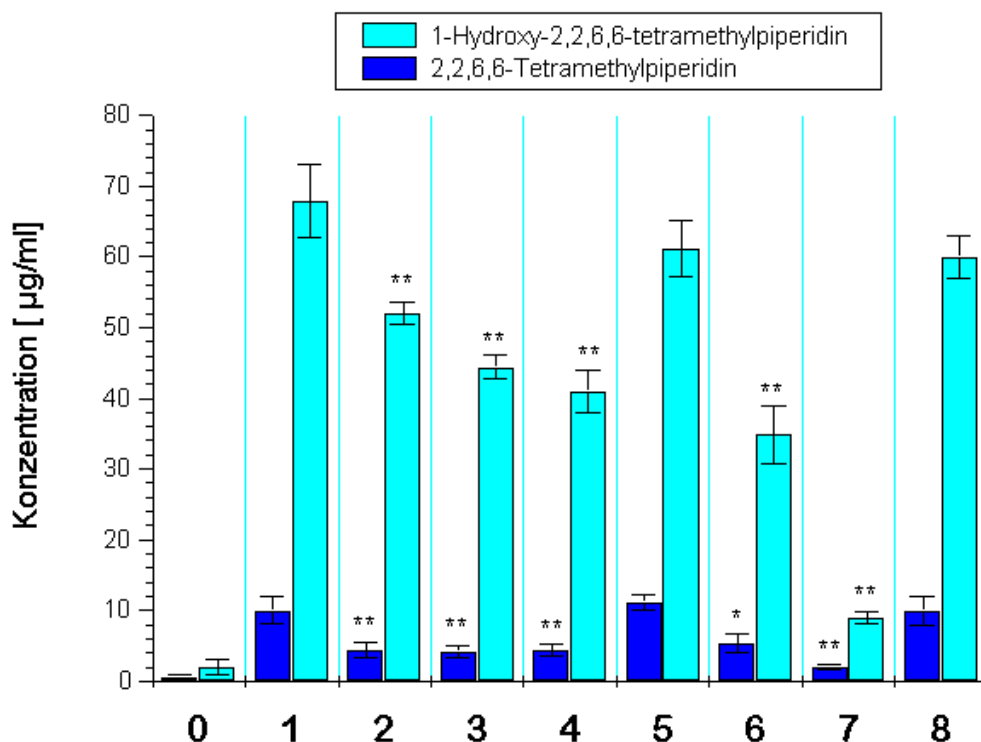


Abbildung 74: Einfluß von verschiedenen Inhibitoren auf die Bildung des Hydroxylamins **1B** und des sekundären Amins **1C** aus dem Nitroxid **1** (156 µg/ml, entspricht 1 mmol·l⁻¹) in HaCaT-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (* P< 0,05, ** P< 0,01; x ± s; n = 5) nach 24h Inkubation. Legende: 0.) **1** (Initialsubstanz ohne Inkubation), 1.) **1** (Kontrollwert ohne Inhibitor) 2.) **1**+ 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (200 µmol·l⁻¹), 3.) **1**+ 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (400 µmol·l⁻¹), 4.) **1**+ 2,6-Dichloroindophenol (400 µmol·l⁻¹), 5.) **1**+ Azelainsäure (200 µmol·l⁻¹), 6.) **1**+ NEM (200 µmol·l⁻¹), 7.) **1**+ NEM (400 µmol·l⁻¹), 8.) **1**+ Metyrapon (200 µmol·l⁻¹).

Wie die obige Abbildung verdeutlicht, führt der Zusatz der Enzyminhibitoren NEM, 2,6-Dichloroindophenol und 2-Chlor-2,4-dinitrobenzen zu einer signifikant verminderten Metabolisierung von **1** im Vergleich zum Kontrollwert (P< 0,01), wobei hiervon insbesondere die Bildung des Hydroxylamin **1B**, als auch die Bildung des sekundären Amins **1C** betroffen

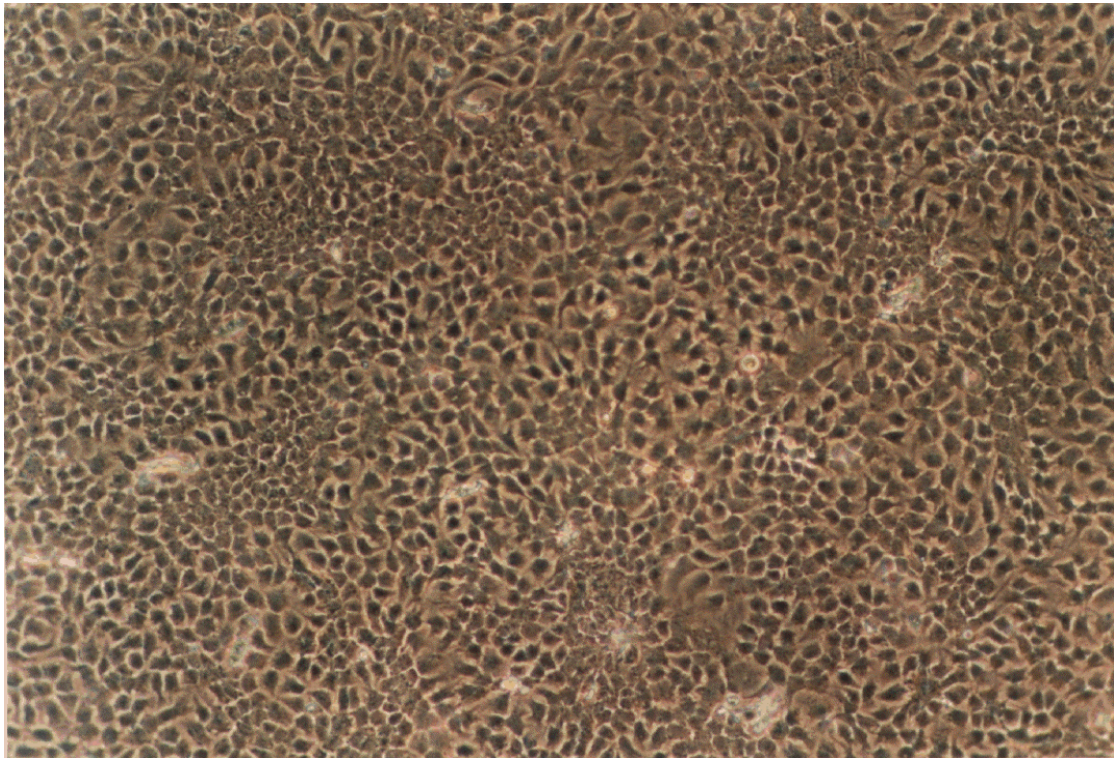
ist. Azelainsäure und Metyrapon blieben bei den durchgeführten Untersuchungen ohne signifikanten Effekt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß sowohl der erste Reaktionsschritt, d.h. die Bildung des Hydroxylamins aus Piperidinnitroxiden, als auch weiter die Bildung des sekundären Amins in Keratinozyten weitgehend über Thiolgruppen bzw. thiolgruppenhaltige Enzymsysteme erfolgt. Vergleichende Untersuchungen zur nichtenzymatischen Reduktion ergaben keine Hinweise auf die Bildung der sekundären Amine. Dazu wurden die Nitroxide ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) mit einem Überschuß an reduziertem Glutathion ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, in isotonischem PBS-Puffer, 37°C) über einen Zeitraum von 2, 4 und 12 h inkubiert.

Eine Beteiligung des Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-System an der Bildung der sekundären Amine ist somit, bedingt durch die Ergebnisse der Arbeiten zur nichtenzymatischen Reduktion und dem in humanen Keratinocyten festgestellten signifikanten Effekt der eingesetzten selektiven Enzyminhibitoren als wahrscheinlich anzusehen [132].

6.4.4 Untersuchungen zur Toxizität von Nitroxiden in Keratinozyten

Für die Validität der Untersuchungen an Zellkulturen ist die Vermeidung toxischer Effekte der verwendeten Substanzen von besonderer Bedeutung. Da die verfügbaren Literaturangaben zur Toxizität der Nitroxide ein unvollständiges und teilweise widersprüchliches Bild ergeben [154, 155], wurden eigene Untersuchungen zur Toxizität der Verbindungen unter Anwendung des Amidoschwarz-Assays [156, 157] durchgeführt. Der speziell für die Untersuchung von Keratinozyten entwickelte Amidoschwarz-Assay beruht in Analogie zum verbreiteten Kristallviolett-Assay [158] auf einer Proteinfärbung der Zellen, die nach Xenobiotikaeinfluß noch an der Kultivierungsgrundlage angeheftet sind. Die Methodik ist zwar als Screening für toxikologische Effekte geeignet, läßt aber keine Differenzierung zwischen verschiedenen Stadien und Mechanismen der Zellschädigung zu. Für eine Abschätzung der Cytotoxizität sowie zur Dosisfindung für die durchgeführten Biotransformationsuntersuchungen bilden die mit Hilfe des Amidoschwarz-Assays gewonnenen IC_{50} -Werte eine ausreichende Datenbasis. Zusätzlich wurden morphologische Veränderungen der Keratinocyten nach Einwirkung von Nitroxylradikalen im Lichtmikroskop beobachtet (siehe Abbildung 75).

A



B

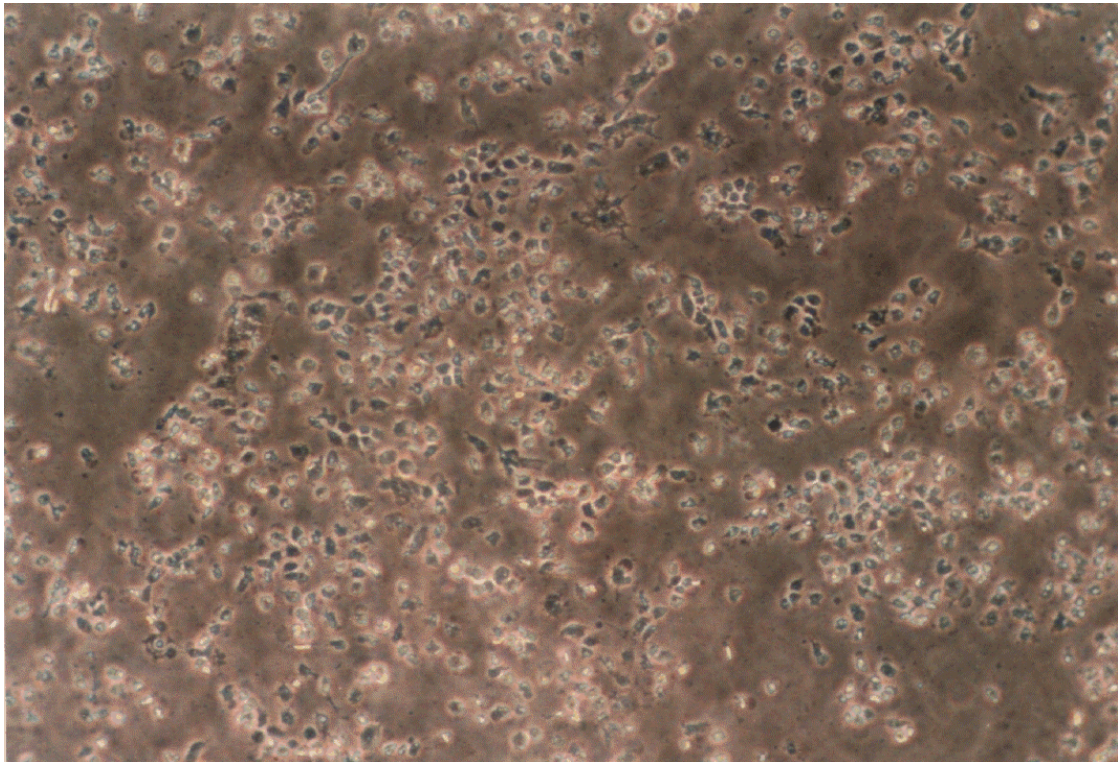


Abbildung 75: Humane Keratinozytenkultur HaCaT mit der Ausbildung einer Monolayerschicht nach 1 Woche Kultivierungszeit (A) ohne und (B) mit anschließendem Zusatz des Nitroxides $1 \text{ } 20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (gelöst in DMSO, Inkubationszeit 6 h).

Für den Amidoschwarz-Assay wurden die HaCaT-Zellen 6 h bzw. 24 h mit den

Untersuchungssubstanzen in entsprechenden Konzentrationen inkubiert, anschließend mit Trypsinlösung von der Unterlage abgelöst, gezählt (CASY® 1 Cell Counter and Analyzer System), mit Amidoschwarz angefärbt und photometrisch vermessen (Spectra II/SLT-Labinstruments Gröding). Für alle Toxizitätsuntersuchungen wurden ein Vergleich (Bahn 1 Zellen ohne Zusatz), zwei Kontrollen (Bahn 2 und 12 mit Lösungsmittel DMSO und Aceton) und 9 Verdünnungen der Probe (restl. Bahnen) als Pipettierschema verwendet. Pro Bahn wurden alle 8 Vials beschickt (max. Kapazität einer 96-Well-Platte). Um die Toxizität der Verbindungen bewerten zu können, wurden die IC_{50} -Werte von drei für die Anwendung an der Haut relevanten Arzneistoffen bestimmt. Dies waren Salicylsäure, Benzocain, Procain und Chloramphenicol. Weiterhin wurde die Cytotoxizität der verwendeten Lösungsmittel DMSO und Aceton überprüft (siehe Abbildung 76). Als Kontrolle wurde ein äquivalentes Volumen Puffermedium verwendet.

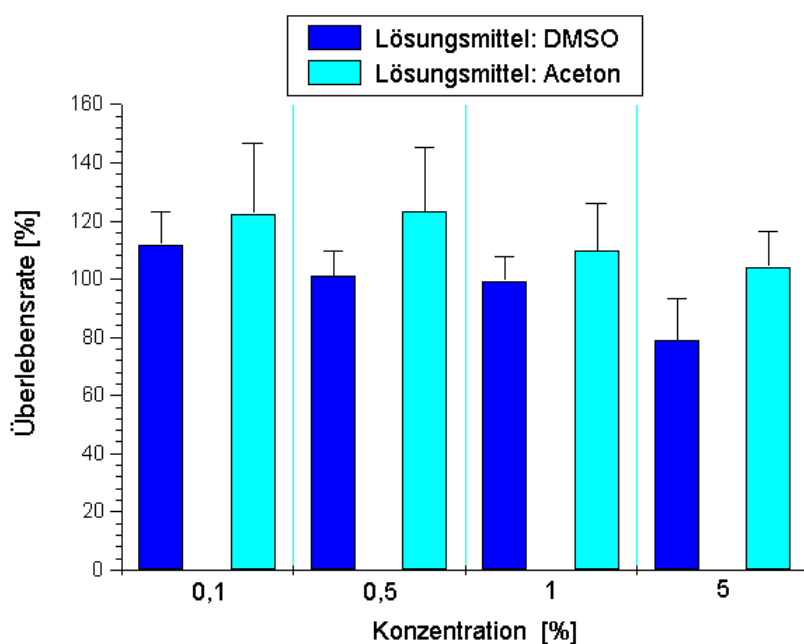


Abbildung 76: Überlebensrate von humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen) nach Inkubation mit den Lösungsmitteln DMSO und Aceton nach 24 h Inkubationszeit.

Die höheren Standardabweichungen bei Aceton könnten auf die hohe Flüchtigkeit der Untersuchungssubstanz zurückgeführt werden. Bei hohen Lösungsmittelkonzentrationen ($> 1\%$) ist mit toxischen Effekten, sowie mit einer veränderten Metabolisierung von Cytochrom P-450-vermittelten Biotransformationsreaktionen zu rechnen [159, 160]. Die Lösungsmiteleinflüsse können aber weitgehend vernachlässigt werden, da bei den durchgeführten Untersuchungen die Konzentration von DMSO und Aceton jeweils unter

0,5% gehalten wurde.

In der folgenden Abbildung 77 ist die Überlebensrate der HaCaT-Zellen als Maß für die Toxizität nach Inkubation mit 1 (Inkubationszeit 24 h) im Vergleich der Meßergebnisse zu den Kontrollwerten dargestellt. Die erhaltenen IC_{50} -Werte sind in Tabelle 33 zusammengefaßt.

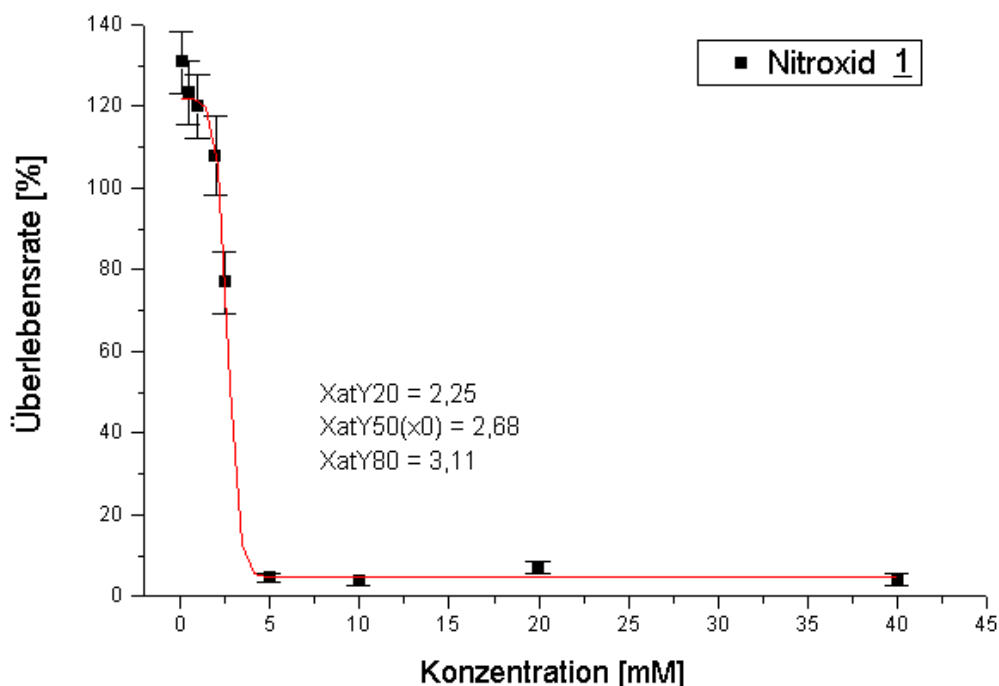


Abbildung 77: Abhängigkeit der Überlebensrate der Keratinozyten (im Vergleich zu den Kontrollwerten nach gleicher Menge DMSO) von der Konzentration des verwendeten Nitroxides 1 nach einer Inkubationszeit von 24 h.

Die Überlebensrate zeigt ein charakteristisches sigmoidales Verhalten in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Untersuchungssubstanz. Im Ergebnis der Untersuchungen an Keratinozyten konnte festgestellt werden, daß die Überlebensrate der HaCaT-Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, mit steigender Nitroxidkonzentration abnimmt. Die erhaltenen IC_{50} -Werte legten die Vermutung nahe, daß die Toxizität der Nitroxylradikale überwiegend mit deren Lipophilie und weniger mit weiteren Substituenteneffekten oder ihrer Biotransformation zusammenhängt. Die daraufhin durchgeführte Regressionsanalyse („Methode der kleinsten Quadrate“) mit der Einflußgröße P (Heptan-Wasser-Verteilungskoeffizient bei pH 7,4) und der IC_{50} als Zielgröße bestätigte

diese Annahme. Eine Korrelationskoeffizient^a von $r = 0,97$ (siehe Abbildung 78) ist für eine Untersuchung mit biologischer Zielgröße als sehr gut anzusehen [161].

Tabelle 33: IC₅₀-Werte nach Inkubation mit den Untersuchungssubstanzen und vier Vergleichssubstanzen in HaCaT-Zellen (Amidoschwarz-Assay; 24 h Inkubationszeit).

Untersuchungssubstanzen	IC ₅₀ [mmol·l ⁻¹] ± s% (10000 HaCaT-Zellen pro Vial)
<u>1</u>	2,7 ± 16
<u>1C</u>	14 ± 24
<u>2</u>	11,4 ± 11
<u>2C</u>	15,8 ± 17
<u>3</u>	7,3 ± 9
<u>4</u>	9,5 ± 12
<u>5</u>	1,1 ± 9
<u>11</u>	11,6 ± 7
<u>12</u>	7,8 ± 10
<u>13</u>	> 15
<i>Vergleichssubstanzen:</i>	
Salicylsäure	16,7 ± 20
Benzocain	11,4 ± 16
Procain	13,5 ± 13
Chloramphenicol	6,6 ± 12

Die Toxizität der untersuchten Nitroxide wird somit ausschließlich durch deren Distribution zwischen den angehefteten Zellen und der Kulturlösung sowie durch das Durchdringungsvermögen von Lipidmembranen bestimmt. Die Radikalfunktion der Nitroxide besitzt, bedingt durch die starke sterische Abschirmung der Methylgruppen, keinen nachweisbaren Einfluß auf die Cytotoxizität der Verbindungen (vgl. z.B. Nitroxid 2 und Amin 2C). Die offensichtliche Differenz der IC₅₀-Werte zwischen Nitroxid 1 (P_{Octanol/Puffer} 63) und Amin 1C (P_{Octanol/Puffer} 5,4) ist durch die unterschiedliche Lipophilie dieser beiden Verbindungen erklärbar.

Das lipophile Benzoessäurederivat 5 besitzt trotz sehr hohem Verteilungskoeffizienten (P >> 100) einen vergleichbaren IC₅₀-Wert wie das unsubstituierte Nitroxid 1. Dieser Effekt könnte, auf die ungenügende Löslichkeit der Untersuchungssubstanz zurückzuführen sein, da das Nitroxid 1 (TEMPO) mit einem gemessenen Verteilungskoeffizient von P = 63 immer noch eine ausreichende Wasserlöslichkeit besitzt. Die Regressionsanalyse mit P_{Octanol/Puffer} (pH 7,4) liefert mit $r = 0,863$ eine etwas schlechte Korrelation (siehe Abbildung 79).

^a Der Korrelationskoeffizient r ist ein Maß für die Abhängigkeit zwischen $\log 1/IC_{50}$ und $\log P$, wobei r zwischen 0 (keine Korrelation) und 1 (vollständige Korrelation) liegen kann.

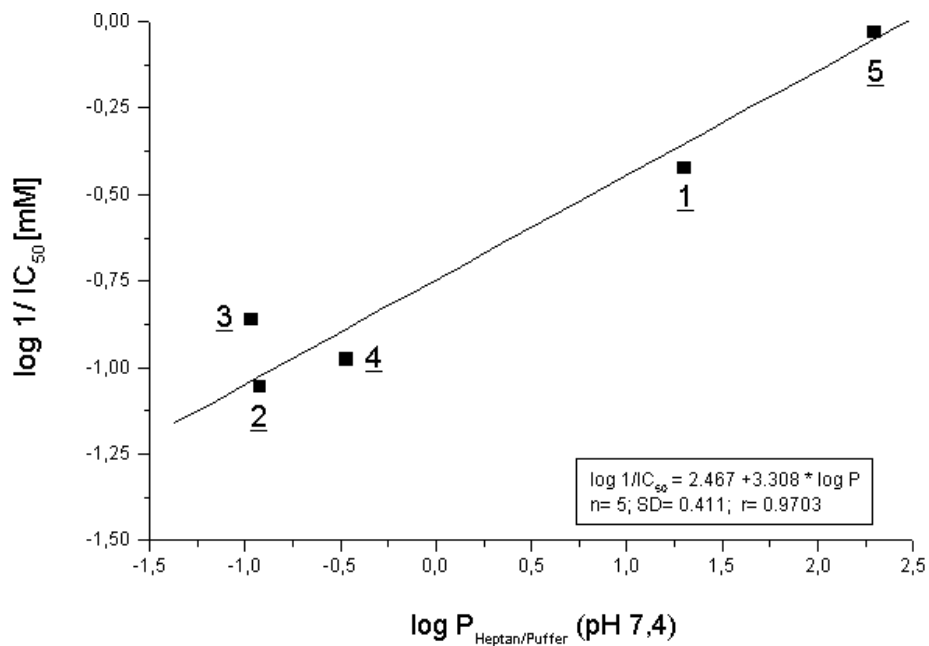


Abbildung 78: Regressionsanalyse zur Cytotoxizität: Einflußgröße P (Heptan-Wasser-Verteilungskoeffizient bei pH 7,4), Zielgröße IC_{50} (Inkubationszeit 24 h).

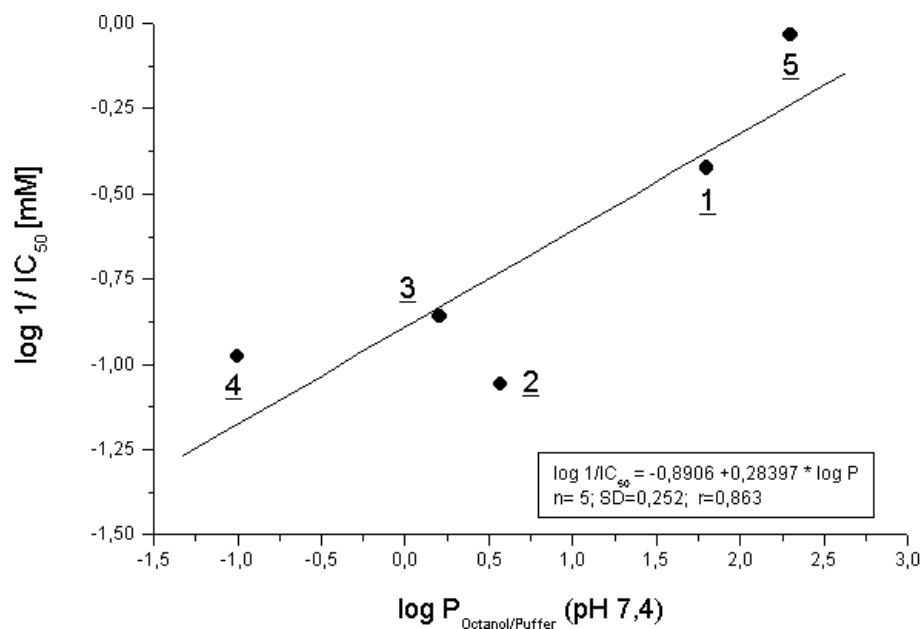


Abbildung 79: Regressionsanalyse zur Cytotoxizität: Einflußgröße P (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient bei pH 7,4), Zielgröße IC_{50} (Inkubationszeit 24 h).

Da der Amidoschwarz-Assay nur eine relativ unspezifische Proteinbestimmung darstellt, ist anhand der bisherigen Ergebnisse nur eine grobe Unterteilung in lebende und abgestorbene Keratinocyten möglich. Um nun eine weitergehende Differenzierung zwischen intakten HaCaT-Zellen und anhaftenden geschädigten Zellen bzw. Zellbruchstücken zu erhalten, wurden Toxizitätsuntersuchungen mit Hilfe des spezifischeren Neutralrot-Assay durchgeführt. Der Neutralrot-Assay beruht auf der Aufnahme und Speicherung des Farbstoffs Neutralrot (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) in den Lysosomen von intakten Zellen [162]. Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran resultieren in einer verringerten Farbstoffretention während der Rücklösung. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: IC₅₀-Werte der Neutralrotfreisetzung in HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Nitroxiden und vier Vergleichssubstanzen mittels Neutralrot-Assay nach 24 h Inkubation.

Untersuchungssubstanzen	IC ₅₀ [mmol·l ⁻¹] ± s% (10000 HaCaT-Zellen pro Vial)
<u>1</u>	3,6 ± 8
<u>1C</u>	0,7 ± 13
<u>2</u>	7,1 ± 14
<u>2C</u>	> 20
<u>3</u>	5,0 ± 17
<u>4</u>	0,5 ± 9
<u>4C</u>	0,4 ± 9
<u>5</u>	0,7 ± 15
<u>6</u>	> 20
<u>9</u>	> 20
<u>11</u>	> 20
Vergleichssubstanzen:	
Salicylsäure	21,5 ± 9
Benzocain	12,2 ± 12
Procain	9,5 ± 20
Chloramphenicol	4,9 ± 11

Bei der Untersuchung der IC₅₀-Werte des Neutralrot-Assays und der zugehörigen Verteilungskoeffizienten der Verbindungen konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

Als Ergebnis der Untersuchungen zur Cytotoxizität der Untersuchungssubstanzen in humanen Keratinocyten mittels Amidoschwarz- und Neutralrot-Assays kann festgestellt werden, daß die Verbindungen weniger bzw. vergleichbar cytotoxisch sind wie die untersuchten definierten Modellarzneistoffe. Die IC₅₀-Werte der Cytotoxizität von Nitroxiden und sekundären Aminen sowie der untersuchten Modellarzneistoffe, bestimmt mit Hilfe des

des Amidoschwarz- und des Neutralrot-Assays, liegen trotz unterschiedlicher chemischer Struktur der Verbindungen in der gleichen Größenordnung.

Bei den Piperidinnitroxiden korreliert die Cytotoxizität weitgehend mit der Lipophilie der Verbindungen (Korrelationskoeffizient $r = 0,96$), so daß bei diesen Verbindungen der paraständige Substituent von besonderer Bedeutung für das cytotoxische Potential der Nitroxide ist.

Mechanistische Aussagen zur Cytotoxizität der Untersuchungssubstanzen in humanen Keratinozyten lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen allerdings nicht ableiten. Hierzu sind tiefergehende Untersuchungen, wie z.B. Enzymaktivitätsmessungen, notwendig, die späteren Arbeiten vorbehalten sind. Prinzipiell wird hier auch die bekannte Problematik der Übertragbarkeit von In-vitro-Untersuchungen auf In-vivo-Bedingungen offensichtlich [163,164], da die besondere Schwierigkeit in der Extrapolation auf die Verhältnisse in vivo und in der Bewertung von sekundären toxischen Veränderungen besteht [165].

Für die durchgeführten Untersuchungen zur Biotransformation von Nitroxiden an Keratinozyten wurden ausschließlich nichttoxische Ausgangskonzentrationen (im Bereich $< / = 1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) verwendet.

6.5 Untersuchungen zu Mechanismen der Reduktion von Nitroxiden in Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln

6.5.1 Problemstellung

In physiologischen Systemen besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Systemen. Die größte Bedeutung als Quelle für reaktive Sauerstoffspezies besitzt, neben dem Purinabbau [166], Katecholaminstoffwechsel [167] und der Einwirkung von UV-Strahlung, die mitochondriale Atmungskette [168]. Zu den wichtigsten mitochondrial generierten Sauerstoffspezies zählen Singulett-Sauerstoff, Superoxid und Hydroxylradikale. Zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der mitochondrialen Atmungskette des Menschen werden Werte von 360 - 400 mmol·l⁻¹/d bei einem O₂-Verbrauch von 400- 500 Liter/ d (Siems et al.[169]) geschätzt (siehe Tabelle 35), wobei in Leber und Niere die Radikalfreisetzung am größten ist.

Tabelle 35: Geschätzte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der mitochondrialen Atmungskette verschiedener Organe^a (nach Siems et al. [169]).

Organ	Sauerstoffverbrauch [nmol/g·min]	Radikalbildung [nmol/g·min]
Niere	2455 - 2902	49 – 58
Leber	2232 - 2679	44 – 53
Gehirn	1339 - 1786	26 – 35
Milz	446	9

^a Berechnung auf der Basis eines Superoxid-Leaks von 2 % und dem O₂-Verbrauch des Menschen

Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen bestand darin, Wechselwirkungen zwischen Nitroxylradikalen und Komponenten der Atmungskette, sowie Nitroxiden und generierten Sauerstoffspezies zu erfassen und Rückschlüsse auf die Reaktionsmechanismen zu ziehen. Im Zusammenhang mit der Reduktion von Nitroxylradikalen zu den korrespondierenden Hydroxylaminen wird bereits seit längerer Zeit diskutiert, daß Komponenten der mitochondrialen Atmungskette in vivo einen entscheidenden Beitrag hierzu liefern dürften [170, 171, 172, 173, 174]. Andererseits wurde auch die Reoxidation von Hydroxylaminen zu den entsprechenden Nitroxylradikalen vermittelt durch mitochondrial generiertes Superoxid^a in der Literatur mehrfach beschrieben [175, 176]. Weiterhin ist bekannt, daß das Superoxid sowohl als Oxidationsmittel, als auch als Reduktionsmittel für Nitroxylradikale fungieren kann und während der Autoxidation von reduziertem Cytochrom b₅₆₆ [177, 178] oder in Anwesenheit von Protonen durch Ubisemichinon in bzw. an der Oberfläche der inneren

^a Exakterweise handelt es sich eigentlich um das Superoxid-Anion.

Mitochondrienmembran freigesetzt wird [179, 180, 181, 182, 183]. Es handelt sich bei der Reduktion von Nitroxylradikalen zu Hydroxylaminen um einen Elektronenübertragung, die erst durch die Anwesenheit von Protonen ermöglicht bzw. irreversibel wird. Der von *Carloni et al.* [184] aufgrund von cyclovoltammetrischen Messungen postulierte Mechanismus einer Rekombination von Nitroxiden und Superoxid zu einer Peroxidstruktur ist umstritten, da hierfür bisher direkte Beweise fehlen, und eine Rekombinationen von Sauerstoffradikalen zu Peroxiden nach allgemeiner Auffassung als unwahrscheinlich anzusehen ist (siehe hierzu auch Kapitel 5).

Trotz der Bedeutung der Atmungskette für das komplexe Reaktionsgeschehen von Nitroxiden und korrespondierenden Hydroxylaminen sind nur wenige systematische Untersuchungen an Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln (SMP) durchgeführt worden. Der überwiegende Anteil der anfangs zitierten Arbeiten zum Reaktionsmechanismus wurde ausschließlich an isolierten intakten Zellen durchgeführt. Neben den eigentlichen Wechselwirkungen mit mitochondrialen Komponenten müssen bei diesen Untersuchungen sowohl eine Vielzahl von weiteren enzymatischen Reaktionen, als auch komplexe Transportprozesse in die Zelle und in subzelluläre Strukturen berücksichtigt werden. Besonders problematisch ist dabei der Einsatz von bestimmten Inhibitoren der Atmungskette in intakten Zellen zu bewerten, da diese dann häufig unspezifisch auch andere Reaktionen hemmen. So hemmt z.B. Cyanid als Komplex-IV (Cytochrom a-a₃ : Cytochrom-c-Oxidase)-Inhibitor ebenfalls die Cu-Zn-SOD in Zellen, während die Mn-SOD der inneren Mitochondrienmatrix nicht beeinflusst wird [185]. Die zu diesem Thema publizierten Ergebnisse und die abgeleiteten Schlußfolgerungen dieser Arbeiten ergeben folglich ein widersprüchliches Bild.

Aus diesem Grunde wurden vertiefende Untersuchungen^a an isolierten Rattenlebermitochondrien und submitochondrialen Partikeln (SMP) durchgeführt.

6.5.2 Untersuchungen an isolierten Mitochondrien

Die Kinetik der Reduktion von fünf verschiedenen Piperidinnitroxiden (**1- 4, 8**) in isolierten Rattenlebermitochondrien wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie unter Stickstoff- / Sauerstoffatmosphäre untersucht. Für die Messungen wurden jeweils Nitroxidlösungen definierter Konzentrationen verwendet. Die Nitroxidlösung und die Mitochondriensuspension wurden auf 37°C temperiert und anschließend intensiv vermischt (Minishaker: 10 s). Nach einer Equilibrierungsphase von 2 min, zur Elimination von Nebeneffekten der verzögerten

^a in Zusammenarbeit mit Prof. Utsumi von der Kyushu-University, Fukuoka (Japan)

Gaspermeation durch den TPX-Schlauch (von Zeus Ind.), wurde die Geschwindigkeit der initialen Reaktionsphase bestimmt. Die Reduktion der paramagnetischen Nitroxide gehorchte bei allen untersuchten Verbindungen einer Reaktion 1. Ordnung und zeigte bei dem stärker lipophilen Piperidinnitroxid **1** (TEMPO) zusätzlich einen biphasischen Verlauf (siehe Abbildung 80).

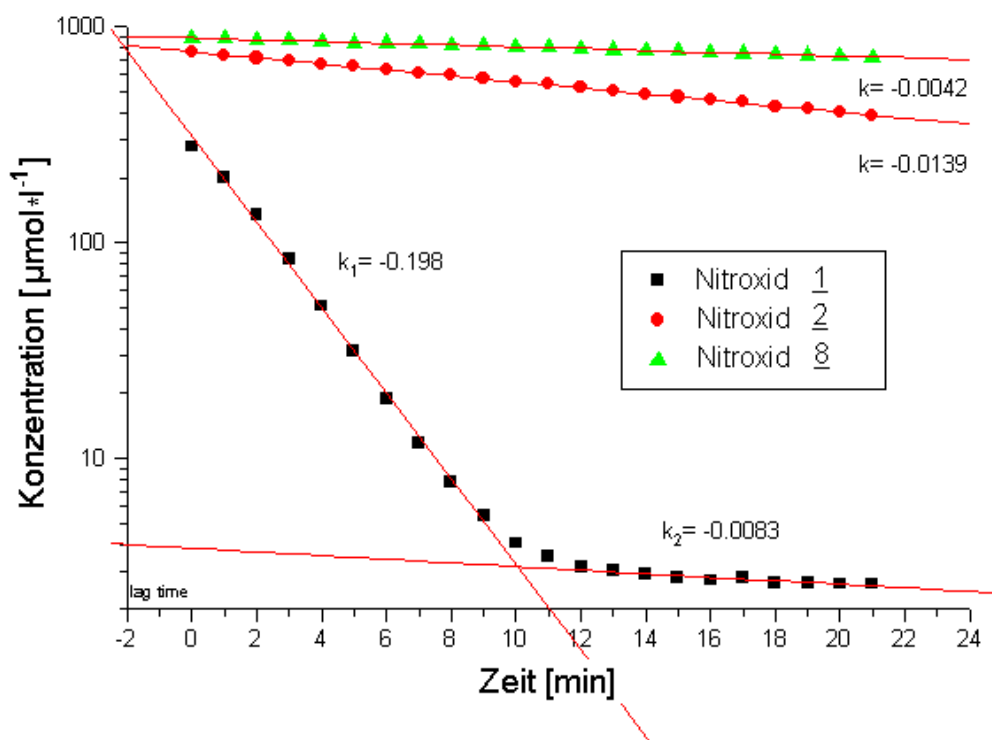


Abbildung 80: Reduktion von Nitroxid **1**, **2** und **8** (Startkonzentration $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) in isolierten Rattenlebermitochondrien in Stickstoffatmosphäre. Die Quantifizierung der Nitroxide erfolgte über die ESR-Signalamplitude.

Die initiale Reduktionsphase der Nitroxide zu den korrespondierenden Hydroxylaminen zeigt eine ausgesprochene Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration. Diese Abhängigkeit ist in der Abbildung 81 für die Reduktion von Nitroxid **1** dargestellt.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen zur Biotransformation von Nitroxylradikalen in isolierten Mitochondrien kann die Bildung weiterer Metaboliten definitiv ausgeschlossen werden (siehe hierzu 6.2.3). Enzymkinetisch betrachtet, handelt es sich somit um eine Zwei-Substrat-Reaktion, die sich mit Hilfe der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik einer Ein-Substrat-Reaktion beschreiben lässt, da $[S_2]$ (die Substratkonzentration des Reduktionspartners) $\gg (K_m)_{S_2}$ angenommen werden kann.

Die Gleichung vereinfacht sich somit zu:

$$v = k \cdot \frac{[E] \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

Die entsprechenden Maximalgeschwindigkeiten (V_{\max}) und die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten (K_m) der Reduktion wurden unter Sauerstoff- und Stickstoffatmosphäre bestimmt und sind in den beiden Abbildungen 82 und 83 gegenübergestellt.

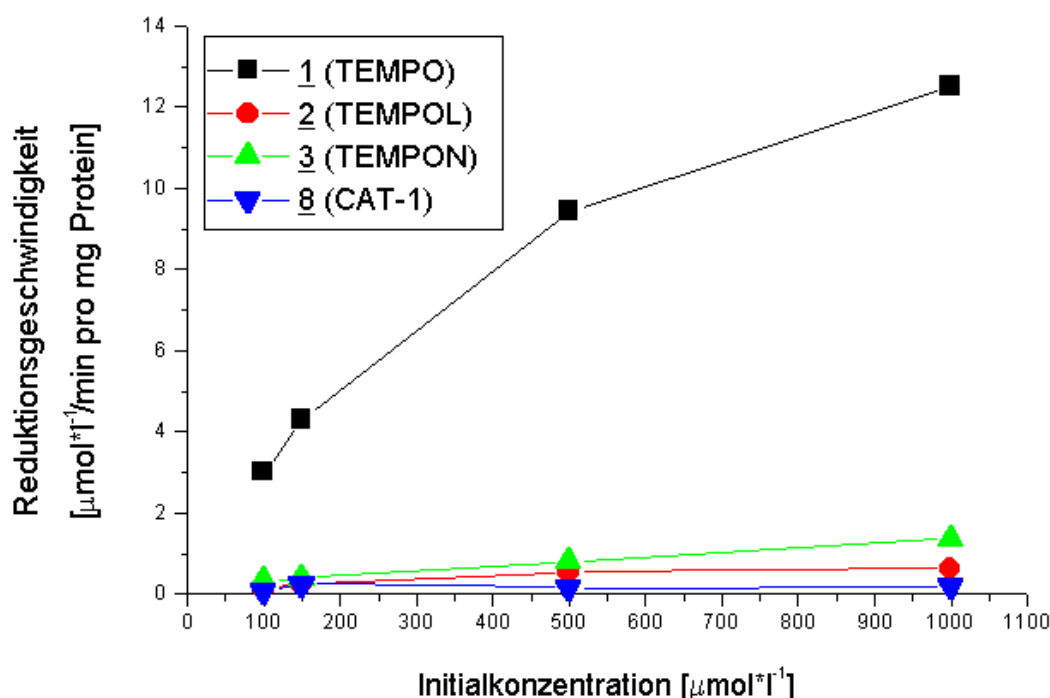


Abbildung 81: Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit in isolierten Rattenlebermitochondrien von der eingesetzten initialen Nitroxidkonzentration.

Während die Maximalgeschwindigkeit der Reduktion mit der Lipophilie der Verbindungen in Korrelation steht (siehe dazu Abbildung 97 Seite 204), ergibt sich für den K_m -Wert kein eindeutiges Bild. Ebenso hat die Zusammensetzung der Atmosphäre einen entscheidenden Einfluß auf die Kinetik der Nitroxidreduktion. Dies bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, welche die Einsatzmöglichkeiten von Nitroxylradikalen als sauerstoffsensitives NMR-Kontrastmittel in Zellkulturen untersucht haben [186].

In-vitro-Biotransformation von Nitroxylradikalen

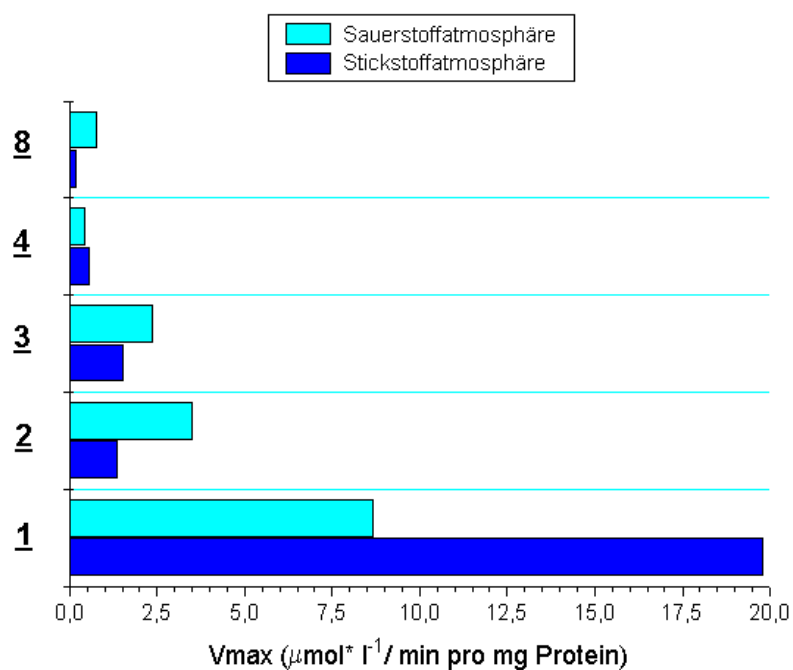


Abbildung 82: Vergleich der initialen Maximalgeschwindigkeiten (V_{\max}) der Reduktion von Piperidinnitroxiden in isolierten Rattenlebermitochondrien unter 100%iger Sauerstoff- bzw. Stickstoffatmosphäre.

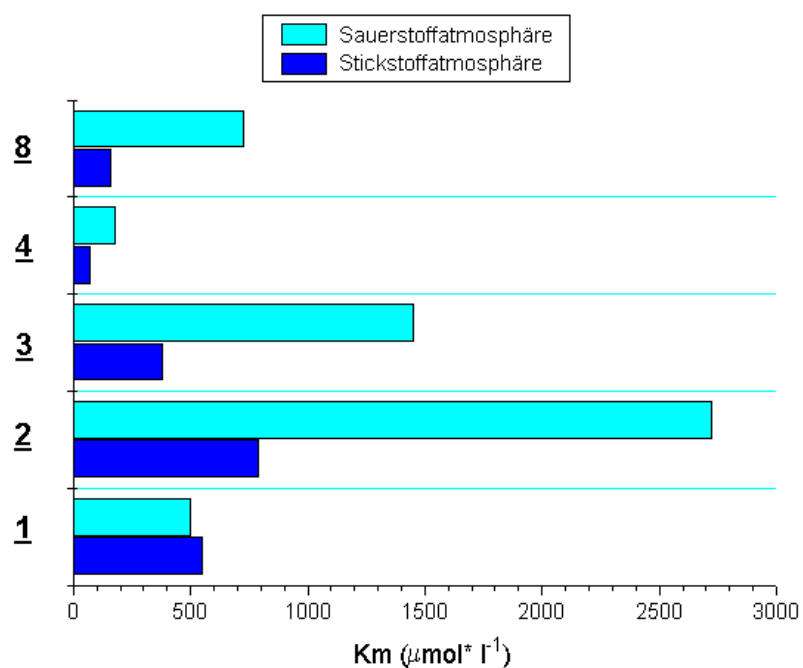


Abbildung 83: Vergleich der MICHAELIS-MENTEN-Konstanten (K_m) der Reduktion von Piperidinnitroxiden in isolierten Rattenlebermitochondrien unter 100%iger Sauerstoff- bzw. Stickstoffatmosphäre.

6.5.3 Einfluß von Inhibitoren auf die Reduktion

Um eine wesentliche Komponente der Atmungskette im Reduktionsgeschehen der Nitroxide näher lokalisieren zu können, wurde der Einfluß von verschiedenen selektiven Inhibitoren auf die Kinetik der Reduktionsreaktion untersucht. Als typische Inhibitoren der Atmungskette wurden Rotenon, Thenoyltrifluoroacetone (TTFA), Antimycin A, Cyanid und Myxothiazol eingesetzt, deren Struktur in Abbildung 84 dargestellt ist.

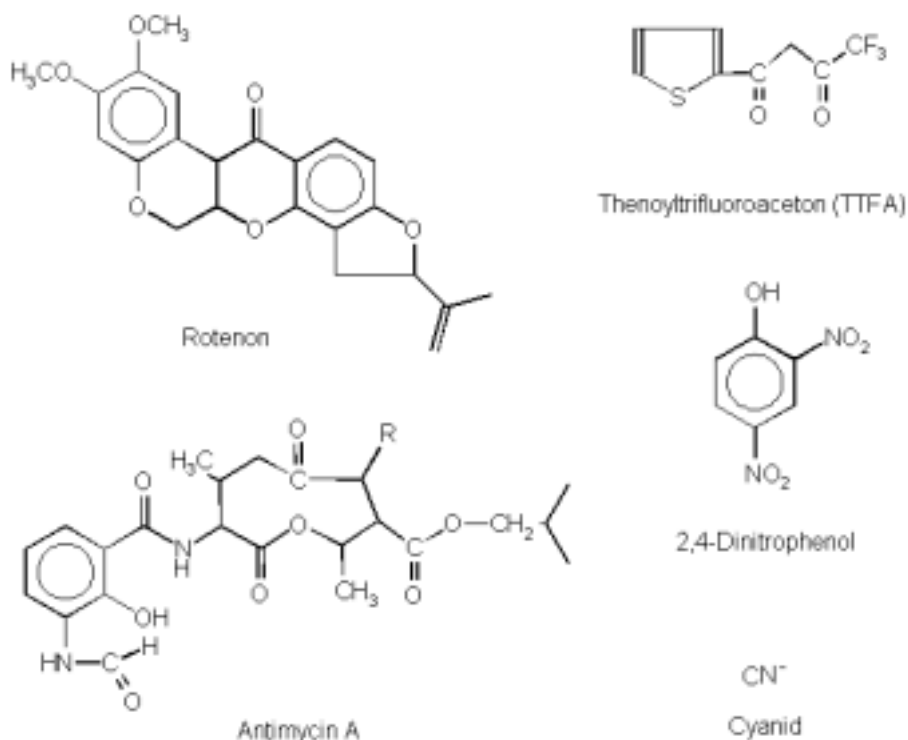


Abbildung 84: Strukturformeln der verwendeten Inhibitoren der Atmungskette.

Während Rotenon, ein Isoflavanderivat, den Komplex I hemmt, bewirkt TTFA eine Hemmung des Elektronenflusses vom Komplex II auf den Ubichinonzyklus. Der Inhibitor Antimycin A blockiert mitochondriales Cytochrom b_{562} im Komplex III, und Myxothiazol hemmt die Cytochrom bc1-Oxidoreduktase und beeinflusst damit die Bildung des Ubisemichonradikals (am *centre o*) aus Ubihydrochinon innerhalb des "*proton motive Q-cycle*" [187]. Cyanid greift am Ende der Atmungskette ein und hemmt die Cytochrom $a-a_3$: Cytochrom-c-Oxidase (EC 1.9.3.1) [188], während 2,4-Dinitrophenol durch Aufhebung des Protonengradienten als Entkoppler von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung fungiert [189, 190]. Die Abbildungen 85 und 86 verdeutlichen den Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Reaktionkinetik unter Stickstoff- bzw. Sauerstoff-Atmosphäre.

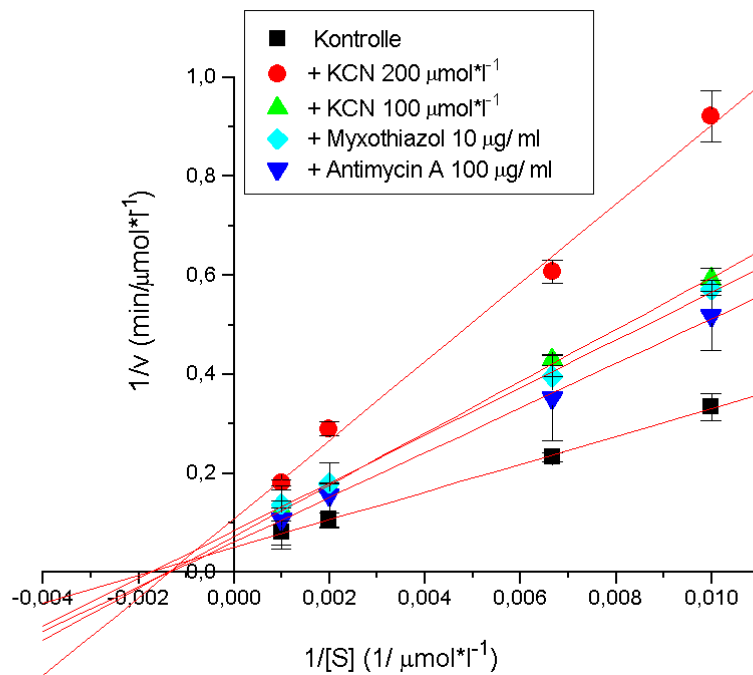


Abbildung 85: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die initiale Phase der Reduktion von Nitroxid 1 in Stickstoffatmosphäre dargestellt als Lineweaver-Burk-Plot. (v gemessen als Abnahme der ESR-Signalintensität; $n = 5$ / Kontrollmessung $n = 10$).

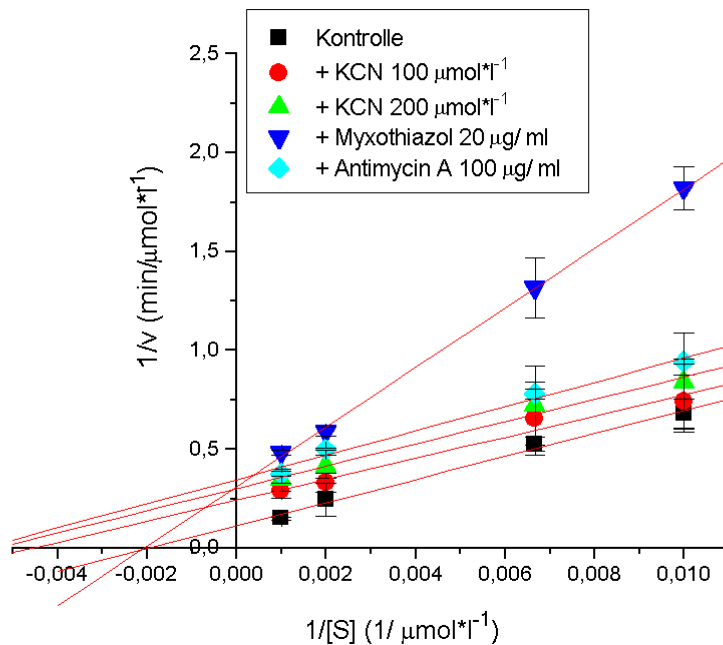


Abbildung 86: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die initiale Phase der Reduktion von Nitroxid 1 in Sauerstoffatmosphäre dargestellt als Lineweaver-Burk-Plot. (v gemessen als Abnahme der ESR-Signalintensität; $n = 5$ / Kontrollmessung $n = 10$).

In den durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß der Effekt der verwendeten Inhibitoren unmittelbar mit dem Sauerstoffpartialdruck in Zusammenhang steht. Die eingesetzten Inhibitoren Cyanid, Myxothiazol und Antimycin A zeigen unter Stickstoffatmosphäre eine nichtkompetitive Hemmung der Reduktionsreaktion. Dies deutet auf eine Beteiligung des Ubichinonsystems am Reaktionsgeschehen hin, da alle Verbindungen diesen Reaktionskreislauf mehr oder weniger direkt beeinflussen. Aufgrund des nichtkompetitiven Effekts von Myxothiazol, ist eine direkte Reduktion der Nitroxidgruppe durch das Ubihydrochinon im Ubichinonkreislauf anzunehmen.

Unter Sauerstoffatmosphäre ändert sich der Effekt der Inhibitoren auf die Kinetik der Reduktionsreaktion entscheidend. Mit Ausnahme des Myxothiazols zeigen alle Verbindungen ein unkompetitives Verhalten. Eine Reoxidation der Nitroxide als Konkurrenzreaktion zur Reduktion ist anzunehmen. Eine Oxidation der Hydroxylamine über generiertes Superoxid im hinteren Bereichen der Atmungskette, möglicherweise über eine Autoxidation von Cytochrom b_{566} [191], ist wahrscheinlich. Die Zunahme der mitochondrialen Superoxidgenerierung unter gleichzeitigen Anstieg des NADH-Verbrauchs nach Zusatz von Antimycin A oder Cyanid wurde in der Literatur mehrfach beschrieben [192]. Dabei stand die Superoxidproduktion in direkten Bezug zur vorhandenen Sauerstoffkonzentration. Der unveränderte Effekt von Myxothiazol als nichtkompetitiver Inhibitor scheint diese Hypothese zu bestätigen, da dieser Inhibitor die Reduktion von Cytochrom b_{566} blockiert und damit die Freisetzung von Superoxid über diesen Mechanismus verhindert (siehe Abbildung 87 und 88).

In-vitro-Biotransformation von Nitroxylradikalen

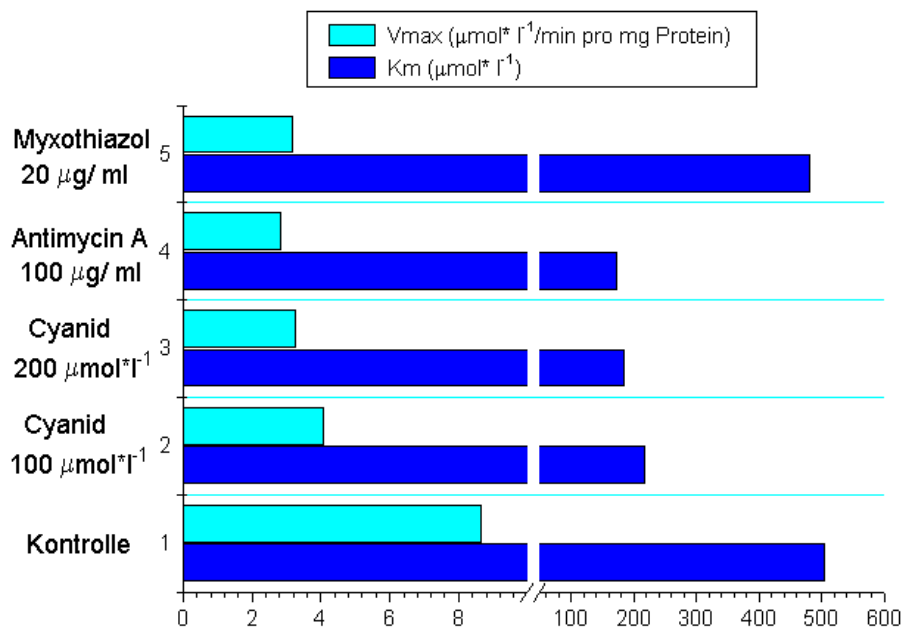


Abbildung 87: Effekt der eingesetzten Inhibitoren auf die V_{max}- und K_m-Werte der initialen Phase der Reduktion von Nitroxid 1 unter Stickstoffatmosphäre in isolierten Mitochondrien.

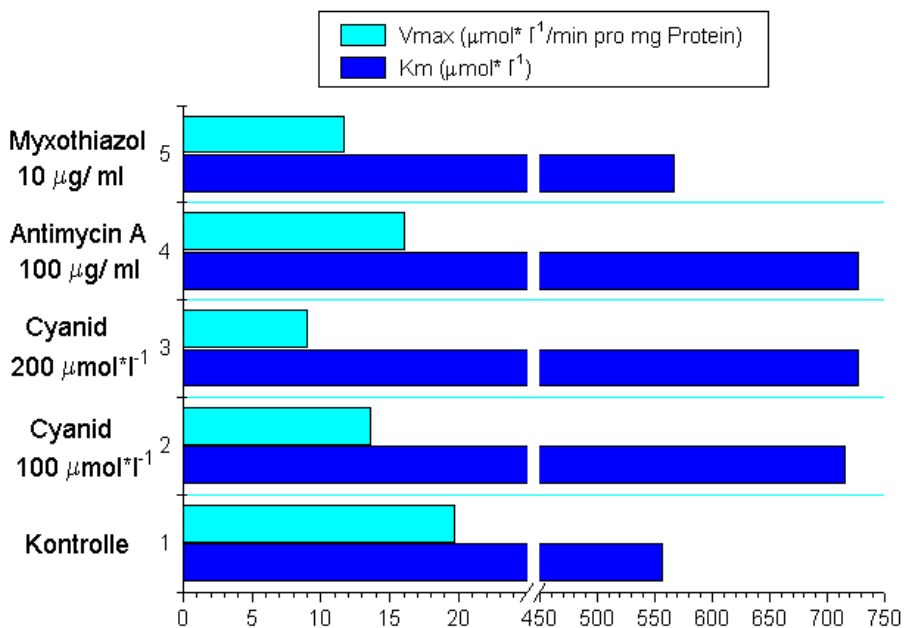


Abbildung 88: Effekt der eingesetzten Inhibitoren auf die V_{max}- und K_m-Werte der initialen Phase der Reduktion von Nitroxid 1 unter Sauerstoffatmosphäre in isolierten Mitochondrien.

6.5.4 Untersuchungen an submitochondrialen Partikeln

Die Ergebnisse der Untersuchungen an submitochondrialen Partikeln (SMP), gewonnen durch Digitoninaufschluß und Ultraschallbehandlung von isolierten Rattenlebermitochondrien, zeigen ebenfalls den starken Einfluß des Sauerstoffs auf das Reduktionsgeschehen und bestätigen damit den für Mitochondrien postulierten Reaktionsmechanismus von Nitroxylradikalen. Während die Maximalgeschwindigkeiten (V_{\max}) der Reduktion von **1** in Mitochondrien und SMP unter Stickstoffatmosphäre ähnlich groß sind, beträgt der V_{\max} -Wert der Reduktion unter Sauerstoffatmosphäre nur noch 1/3 des Wertes der Reaktion in Mitochondrien (siehe Abbildung 89). Dies kann auf die verstärkte Reoxidation des Hydroxylamines zum paramagnetischen Nitroxylradikal zurückgeführt werden [193, 194], da die Membranorientierung der inneren Mitochondrienmembran in SMP umgekehrt ist und das Enzym Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) der Mitochondrienmatrix nicht mehr vorhanden ist. Dieses Enzym ist im antioxidativen Schutzsystem von besonderer Bedeutung, da in intakten Mitochondrien die Dismutation von gebildeten Superoxid zu Wasserstoffsuperoxid und Sauerstoff katalysiert wird.

Für das kationische, stark hydrophile Nitroxylradikal **8** ergibt sich in SMP ein ähnliches Reaktionsverhalten wie für Verbindung **1** (siehe Abbildung 90).

Die Differenz der V_{\max} -Werte (gemessen in Mitochondrien und SMP unter Stickstoffatmosphäre) könnte auf die erleichterte Permeation von Nitroxid **8** zum Ort der Reduktion bedingt durch die veränderte Orientierung der inneren Mitochondrienmembran (Umklappen der Membran) in SMP zurückgeführt werden. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten (K_m) der initialen Reduktionsphase zeigen trotz unterschiedlicher Absolutwerte für beide Nitroxide keinen Unterschied zwischen Mitochondrien und SMP in Stickstoffatmosphäre. Die Membranorientierung der inneren Mitochondrienmembran hat somit keinen Einfluß auf den K_m -Wert der Reduktion unter Stickstoffatmosphäre.

Während die K_m -Werte für die Reduktionsreaktion unter Stickstoffatmosphäre in Mitochondrien und SMP ähnlich große Werte annehmen, sind die K_m -Werte der Reduktion unter Sauerstoffatmosphäre in SMP im Vergleich zu intakten Mitochondrien stark vermindert. Sowohl für Nitroxid **1**, als auch für **8** beträgt der K_m -Wert der Reduktionsreaktion in SMP nur ca. 1/5 des anhand der Meßdaten berechneten K_m -Wertes in Mitochondrien. Die Veränderung der Membranorientierung der inneren Mitochondrienmembran und die Entfernung der Mitochondrienmatrix in SMP hat einen offensichtlichen Einfluß auf den K_m -Wert der Reduktionsreaktion von Nitroxiden in SMP unter Sauerstoffatmosphäre.

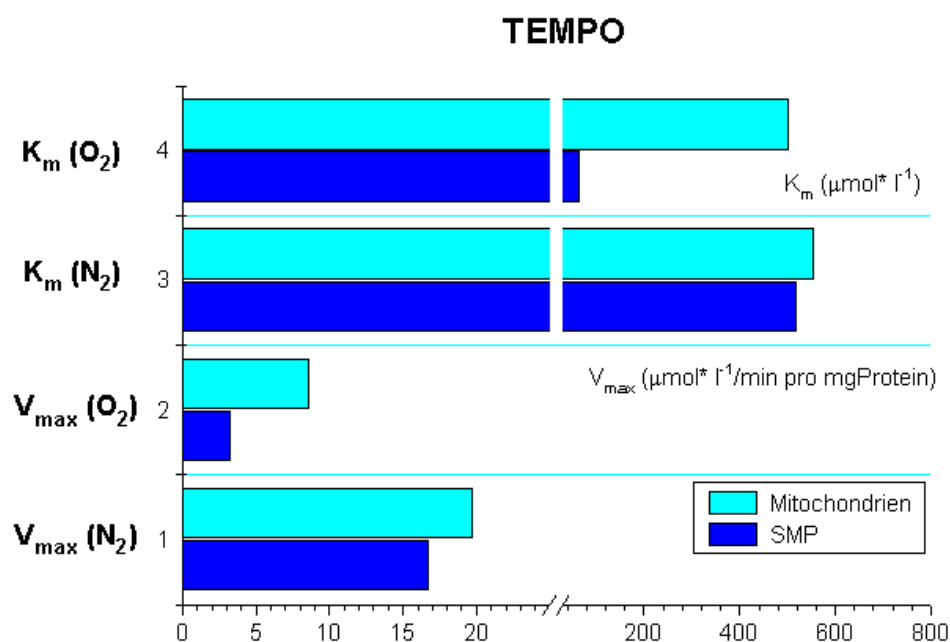


Abbildung 89: Vergleich der V_{\max} - und K_m -Werte für die initiale Phase der Reduktion von Piperidinnitroxid 1 zum diamagnetischen Hydroxylamin in isolierten Mitochondrien und SMP.

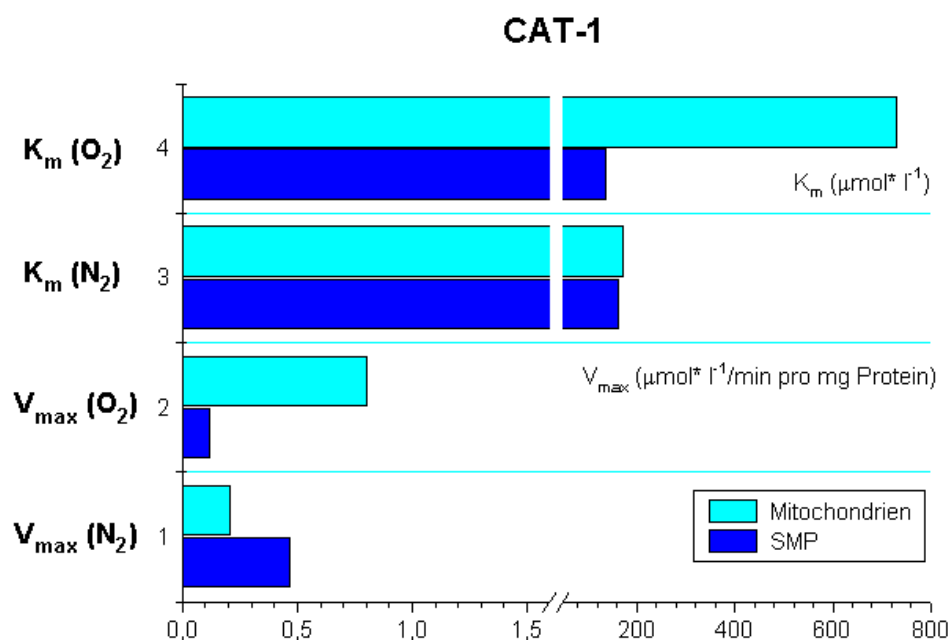


Abbildung 90: Vergleich der V_{\max} - und K_m -Werte für die initiale Phase der Reduktion von Piperidinnitroxid 8 zum diamagnetischen Hydroxylamin in isolierten Mitochondrien und SMP.

6.5.5 Untersuchungen zur Reoxidation von Hydroxylaminen

Die Reoxidation von diamagnetischen Hydroxylaminen zu paramagnetischen Nitroxylradikalen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben [175, 176]. Hier ist sowohl eine Konkurrenzreaktion zur Reduktion auf der Stufe der Cytochromoxidase, als auch eine Oxidation der gebildeten Hydroxylamine über generiertes Superoxid möglich [180]. Dieses Superoxid wird im Endbereich der mitochondrialen Atmungskette möglicherweise über eine Autoxidation von reduziertem Cytochrom b_{566} freigesetzt. Die Zunahme der mitochondrialen Superoxidfreisetzung unter gleichzeitigem Anstieg des NADH-Verbrauchs nach Zusatz von Antimycin A oder Cyanid wurde in der Literatur ebenfalls mehrfach beschrieben [178]. Dabei stand die Superoxidproduktion vorwiegend in direkter Abhängigkeit zum gemessenen Sauerstoffverbrauch.

In den hier durchgeführten Untersuchungen sollte durch Variation der Versuchsbedingungen der Einfluß von Sauerstoff auf das Ausmaß der Reoxidation von diamagnetischen Hydroxylaminen zu paramagnetischen und damit ESR-aktiven Nitroxylradikalen untersucht werden. Die Abschätzung der Bedeutung des mitochondrialen "Superoxidlecks" für diese Reoxidation war von besonderem Interesse, da sich durch diese Reaktion die Möglichkeit einer direkten und nichtinvasiven Erfassung von Superoxid bietet. Weiterhin wurde angestrebt, durch Einsatz selektiver Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette den eigentlichen Reaktionsort dieser Oxidation näher zu charakterisieren.

Das Reduktions- und Oxidationsverhalten von zwei verschiedenen Hydroxylaminen mit Piperidinstruktur (**1B** und **2B**) wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie unter Sauerstoff- bzw. Stickstoffatmosphäre untersucht. Hierzu wurden definierte Stickstoff-Sauerstoff-Mischungen hergestellt. Die Anfangskonzentration der Hydroxylamine betrug $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Für die Messungen wurden die bei -80°C unter Stickstoff gelagerten Hydroxylamine in stickstoffgespülten PBS-Puffer gelöst, mit der frisch hergestellten SMP-Suspension intensiv vermischt und in einen gasdurchlässigen TPX-Schlauch (von Zeus Ind.) übergeführt. Die so hergestellte Probe wurde anschließend in den mit den entsprechenden Gasmischungen vorgespülten Resonator ($\geq 10 \text{ min}$) des ESR-Spektrometers übergeführt. Nach einer Equilibrierungsphase von 2 min wurde die Spektrenregistrierung gestartet. Voruntersuchungen haben gezeigt, daß diese Zeit zur Gleichgewichtseinstellung zwischen Probe und Resonatorinnenraum ausreichend ist. Nebeneffekte der verzögerten Gaspermeation durch den verwendeten TPX-Schlauch werden somit ausgeschlossen. Während der ESR-Messung wurde die Zusammensetzung der Atmosphäre im Resonator gezielt verändert und die aktuelle Radikalkonzentration direkt über die ESR-Signalintensität

ermittelt. Die zur Quantifizierung notwendigen Kalibrierfunktionen wurden unter definierten Sauerstoff-Stickstoff-Verhältnissen erstellt, um den linienverbreiternden Effekt des Sauerstoffs zu berücksichtigen. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte eine eindeutige Abhängigkeit des Reaktionsverhaltens der Hydroxylamine bzw. Nitroxide in SMP von der Verfügbarkeit des Sauerstoffs festgestellt werden (siehe Abbildung 91).

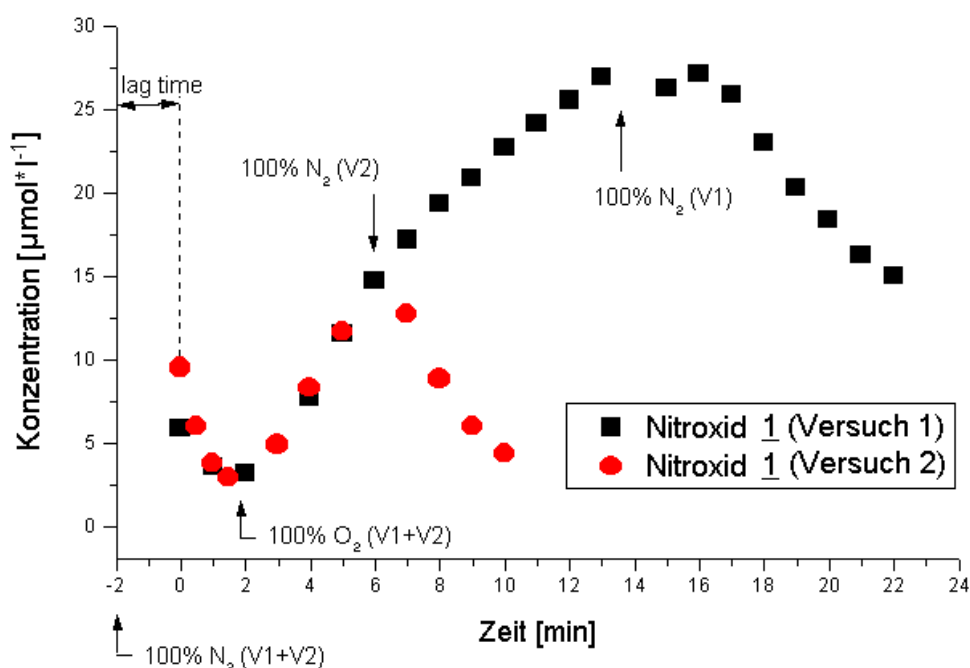
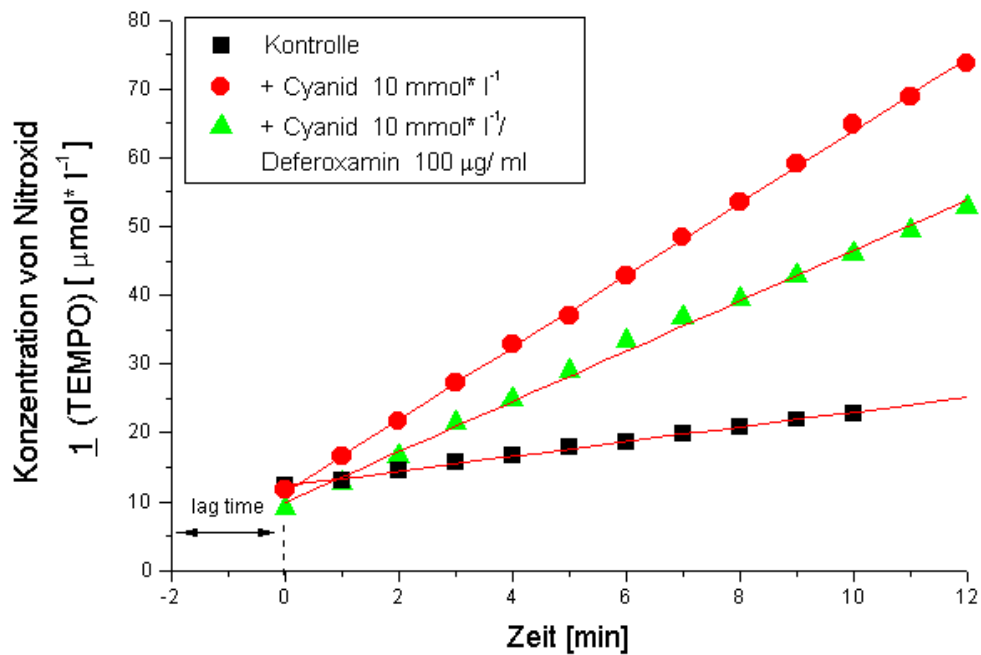


Abbildung 91: Reoxidation vom Hydroxylamin **1B** ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) zum korrespondierendem Nitroxylradikal **1** in SMP in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Sauerstoff. Während die Radikalkonzentration unter Sauerstoffatmosphäre ansteigt, führt Stickstoffspülung des Resonators zu einem Überwiegen der Reduktionsreaktion.

Unter Stickstoffatmosphäre lässt sich in SMP (nach Hydroxylaminzusatz) eine schnelle Reduktion des vorhandenen Nitroxidanteils feststellen, wobei die Geschwindigkeit der Reaktion (1.Ordnung) vergleichbar ist mit den Beobachtungen, welche in intakten Mitochondrien erhalten wurden. Unter Sauerstoffatmosphäre ändert sich aber das Reaktionsverhalten. Hier überwiegt die Reoxidation der Hydroxylamine.

Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, und um die Frage der möglichen Beteiligung der Cytochrom-c-Oxidase in diesen Prozess zu klären, wurden Arbeiten mit selektiven Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette (z.B. TTFA und Cyanid) durchgeführt sowie Komplexbildner eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 92 und 93 dargestellt.

A



B

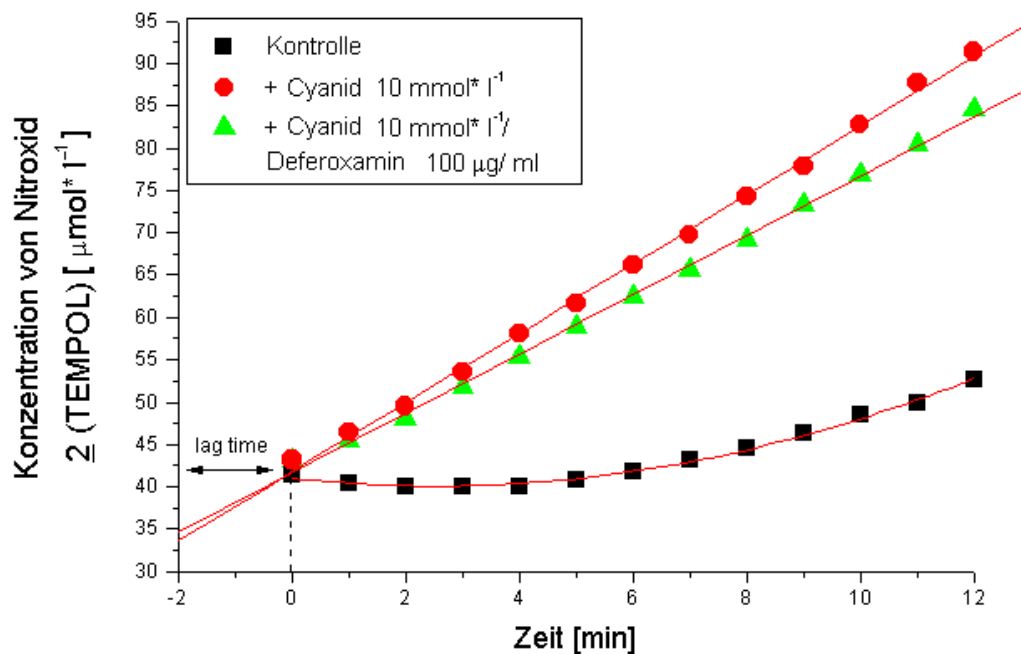


Abbildung 92: Reoxidation von Hydroxylamin **1B** ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) zu Nitroxid **1** (A) bzw. **2B** ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) zu **2** (B) in SMP unter Sauerstoffatmosphäre sowie Einfluß von Cyanid (Cytochrom-c-Oxidaseinhibitor) und Deferoxamin (Komplexbildner) auf die Oxidation.

Während in SMP eine Reoxidation der Hydroxylamine auftritt, konnte eine solche Reaktion in isolierten Mitochondrien nicht festgestellt werden. Hier überwiegt auch unter einem unphysiologisch hohem Sauerstoffangebot (O_2 100%) die reduktive Komponente. Da mit der Präparation der SMP auch die Mn-SOD weitgehend aus der Matrix entfernt wurde, könnte die Reoxidation der Hydroxylamine in SMP auf generiertes Superoxid zurückzuführen sein.

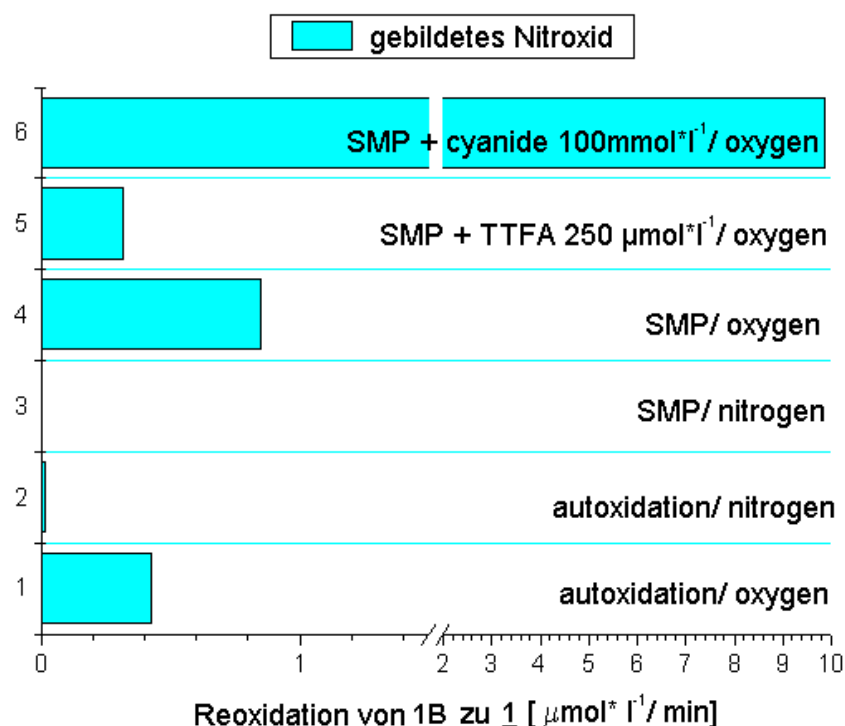


Abbildung 93: Einfluß von Cyanid und TTFA auf die Reoxidation von Hydroxylamin **1B** zum korrespondierenden Nitroxylradikal **1** (TEMPO) unter Stickstoff- bzw. Sauerstoffatmosphäre im Vergleich zu Kontrollmessungen und zur Autoxidation der Hydroxylamine.

Als Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß sowohl Hydroxylamin **1B**, als auch **2B** unter Sauerstoffatmosphäre zu dem entsprechenden Nitroxylradikal reoxidiert wird. Cyanid als Cytochrom-c-Oxidaseinhibitor hemmt diese Reaktion nicht, sondern steigert die Oxidation sogar signifikant ($N=5$; $P<0,01$), während TTFA wiederum die Reoxidation auf den Wert der normalen Autoxidation der Hydroxylamine vermindert. Die Befunde legen die Vermutung nahe, daß die Reoxidation der Hydroxylamine in SMP mit hoher Wahrscheinlichkeit durch generiertes Superoxid vermittelt wird. Zu dieser Fragestellung sind aber noch weitere Untersuchungen notwendig.

Durch Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase wird die Endstufe der Atmungskette direkt blockiert. Dabei wird der vorhandene Sauerstoff in einer Parallelreaktion mittels Ubisemichinon zum Superoxid reduziert, welches nun selbst wiederum die Hydroxylamine zu

den Nitroxiden reoxidiert. Durch die Anwendung des Inhibitors TTFA wird die Elektronenzufuhr von der Succinat-Dehydrogenase zum Ubichinonzyklus gehemmt. Somit kann weniger Superoxid gebildet werden, da die Anzahl der Reduktionsäquivalente abnimmt. Die Reoxidationsreaktion sinkt auf das Niveau der normalen Autoxidation ab.

In die Reaktion von Hydroxylaminen mit Superoxid sind möglicherweise zusätzlich noch Übergangsmetalle (wie Fe^{3+} oder Cu^{2+}) involviert, da eine Kombination von Cyanid und dem Komplexbildner Deferoxamin die maximale Nitroxalradikalbildung pro Zeiteinheit bewirkt. Eine abschließende Bewertung dieser Beobachtung ist z.Z. aber nicht möglich, da zum Einfluß von Übergangsmetallen auf die Reoxidation von Hydroxylaminen auch divergierende Befunde in der Literatur vorliegen [195].

Die durchgeführten Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von stabilen Nitroxylradikalen und den entsprechenden korrespondierenden Hydroxylaminen in isolierten Mitochondrien ergaben das im folgenden dargestellte Bild (siehe Abbildung 94):

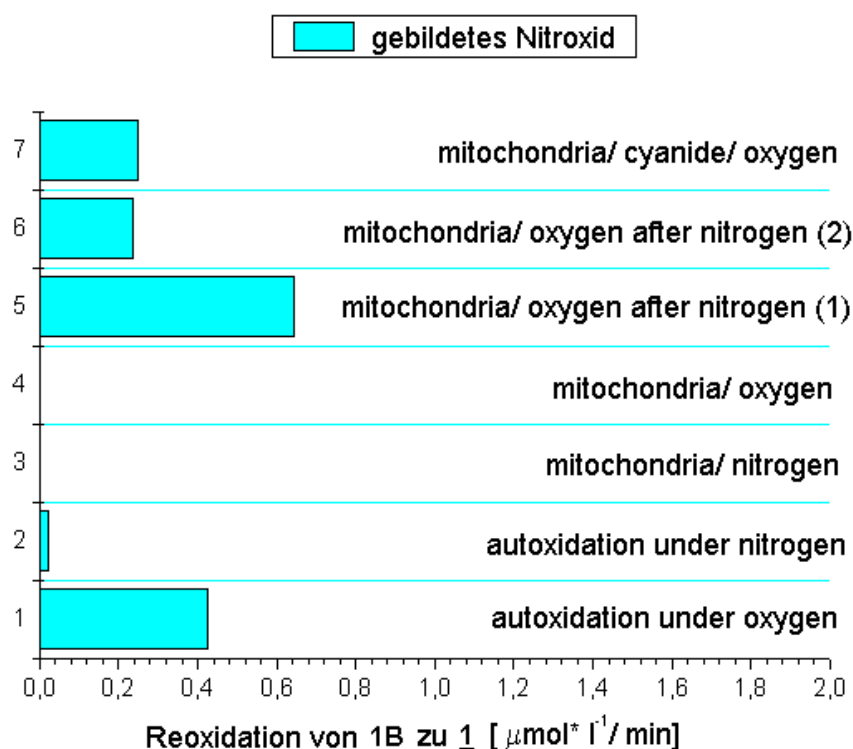


Abbildung 94: Vergleich der Reoxidationsrate des Hydroxylamins **1B** zum korrespondierenden Nitroxylradikal **1** (TEMPO) unter Stickstoff- bzw. Sauerstoffatmosphäre in isolierten Mitochondrien und SMP.

In intakten Mitochondrien läßt sich somit summarisch keine Reoxidationsreaktion nachweisen. Erst nach Zugabe des Inhibitors Cyanid oder nach Vorinkubation der isolierten

Mitochondrien unter Stickstoffatmosphäre (Versuch 1= 15 min; Versuch 2= 5 min) tritt eine meßbare Oxidation der Hydroxylamine auf. Diese Oxidationsreaktion übersteigt mengenmäßig (mit Ausnahme nach fünfzehnminütiger Vorinkubation mit Stickstoff) die Autoxidation der Hydroxylamine nicht.

6.5.6 Diskussion der Befunde und Schlußfolgerungen

Für die durchgeführten Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von stabilen Nitroxylradikalen und den entsprechenden korrespondierenden Hydroxylaminen ist der Vergleich der Ergebnisse an Mitochondrien und SMP von besonderem Interesse, da hier Schlußfolgerungen zu Reaktionsmechanismen und Einflußfaktoren gezogen werden können. Sowohl in Mitochondrien, als auch in SMP erfolgte eine Reduktion von Nitroxiden zu Hydroxylaminen. Während in SMP auch eine Reoxidation der gebildeten Hydroxylamine nachweisbar ist, tritt diese in intakten Mitochondrien erst nach Zusatz von Inhibitoren der Atmungskette oder nach längerer Ischämiephase auf. Da die verstärkte Superoxidfreisetzung unter diesen unphysiologischen Bedingungen schon länger bekannt ist, läßt sich diese Oxidationsreaktion auf mitochondrial gebildetes Superoxid zurückführen. Eine Beteiligung der Cytochrom-c-Oxidase an dieser Reaktion kann dagegen ausgeschlossen werden, da eine Inhibition dieses Enzyms keinen Einfluß auf die Reduktionskinetik besitzt. Die eingangs zitierten Arbeiten von *Nohl et al.* und *Cadenas et al.* untermauern diese Schlußfolgerungen, da sie bei ihren Untersuchungen keine Superoxidfreisetzung durch den Komplex-IV der Atmungskette feststellen konnten.

Bei den Untersuchungen zum Mechanismus der mitochondrialen Reduktion von Nitroxylradikalen konnte durch Variation des Sauerstoffpartialdruckes und durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren der Ort der Nitroxidreduktion auf den Ubichinonzyklus eingegrenzt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist das Ubihydrochinon verantwortlich für die Elektronenbereitstellung. Da die Redoxpotentiale des mitochondrialen Ubichinon-Ubihydrochinon-Systems unter physiologischen Bedingungen bei ca. +100 mV liegen, können die untersuchten Nitroxide sehr gut reduziert werden (siehe zum elektrochemische Reduktionsverhalten der Nitroxide Kapitel 5.2).

Da Ubichinon in der inneren Mitochondrienmembran in großem (mehr als zehnfachen) Überschuß vorliegt, steht somit bei entsprechendem Angebot an Reduktionsäquivalenten ein großer Pool an Elektronenlieferanten für die Reduktion von Nitroxiden zur Verfügung. Die Bindung von Protonen erfolgt dann anschließend an der Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran und führt zur irreversiblen Reduktion durch Bildung der

Hydroxylamine.

Auf Grundlage der ausgewerteten Literatur und der eigenen Untersuchungen kann folgender Mechanismus für die mitochondriale Reduktion von Nitroxylradikalen postuliert werden (siehe Abbildung 95).

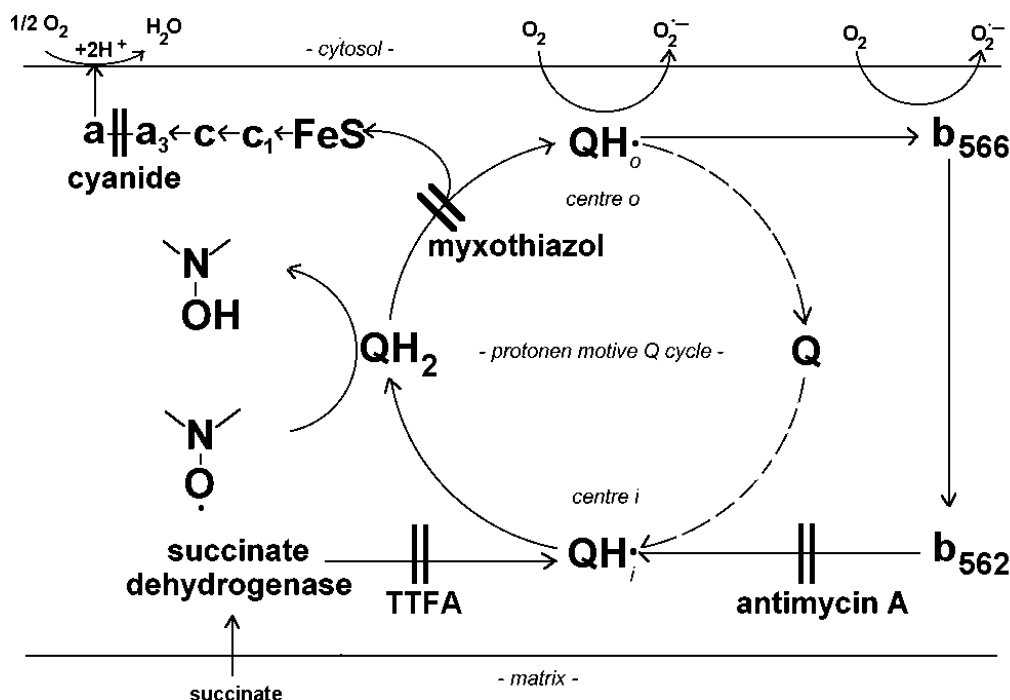


Abbildung 95: Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse postuliertes Reaktionsschema der Reduktion von Nitroxylradikalen zu diamagnetischen Hydroxylaminen durch Komponenten der mitochondrialen Atmungskette.

Dieser Interpretationsansatz steht in Übereinstimmung zu Untersuchungsergebnissen von *Herrmann et al.* [196], der bei In-situ-Sauerstoffmessungen an verschiedenen Mikroorganismen feststellen konnte, daß der Zusatz von Nitroxylradikalen den Sauerstoffverbrauch dieser Organismen konzentrationsabhängig signifikant vermindert. Somit könnten die paramagnetischen Nitroxide als Elektronenakzeptoren in der Atmungskette fungieren, die den Elektronenfluß zu den nachgeordneten Komponenten der Atmungskette hemmen und die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser vermindern. Erste orientierende Messungen zum Sauerstoffverbrauch in Mitochondrien mit Hilfe der Clark-Elektrode konnten diesen Effekt nicht bestätigen. Der Zusatz von Nitroxid **1** bzw. **2** führte zur einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, während Verbindung **1B** eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs bewirkte (siehe Abbildung 96).

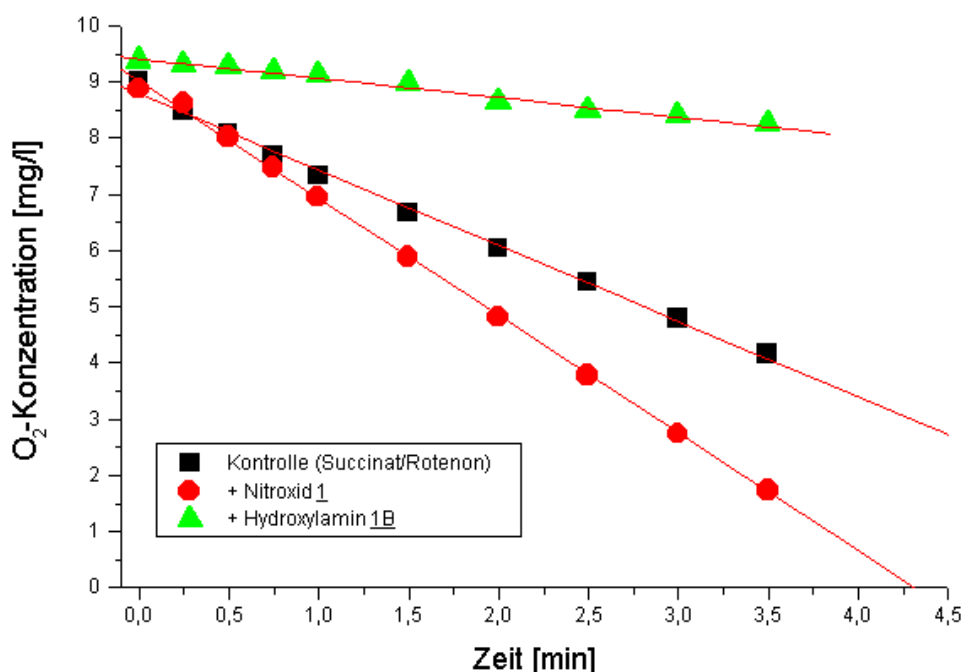


Abbildung 96: Effekte von Nitroxid 1 und Hydroxylamin 1B auf den Sauerstoffverbrauch von isolierten Rattenlebermitochondrien in der "state 4"-Atmung (gemessen mittels Clark-Elektrode).

Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen von *Henke et al.* [197] zum Einfluß von Nitroxiden auf die Atmung von Nierenmitochondrien. Eine fundierte Erklärung für diesen offensichtlichen Widerspruch zwischen dem Reduktionsverhalten der Nitroxide und deren Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch der Atmungskette in den Mitochondrien steht z.Z. noch aus. Allerdings ist bei der Interpretation dieser O₂-Messungen, ebenso wie bei den erwähnten Ergebnissen von *Henke et al.* [197], zu berücksichtigen, daß nach Substratzusatz innerhalb weniger Minuten die Sauerstoffkonzentration in der Lösung auf den Wert 0 absinkt. Somit verändert sich die Sauerstoffkonzentration bei dieser Bestimmung sehr schnell und schon nach wenigen Minuten herrschen völlig anaerobe Bedingungen, während die ESR-Untersuchungen zum Reduktionsverhalten der Nitroxide ausschließlich unter definierten Sauerstoff-/ Stickstoff-Verhältnissen durchgeführt wurden. Zur abschließenden Diskussion der Befunde sind somit noch weitere detaillierte Untersuchungen möglicherweise auch unter Einsatz zusätzlicher analytischer Methoden nötig.

Im folgendem wurde der Einfluß von Stoffeigenschaften auf das unterschiedliche

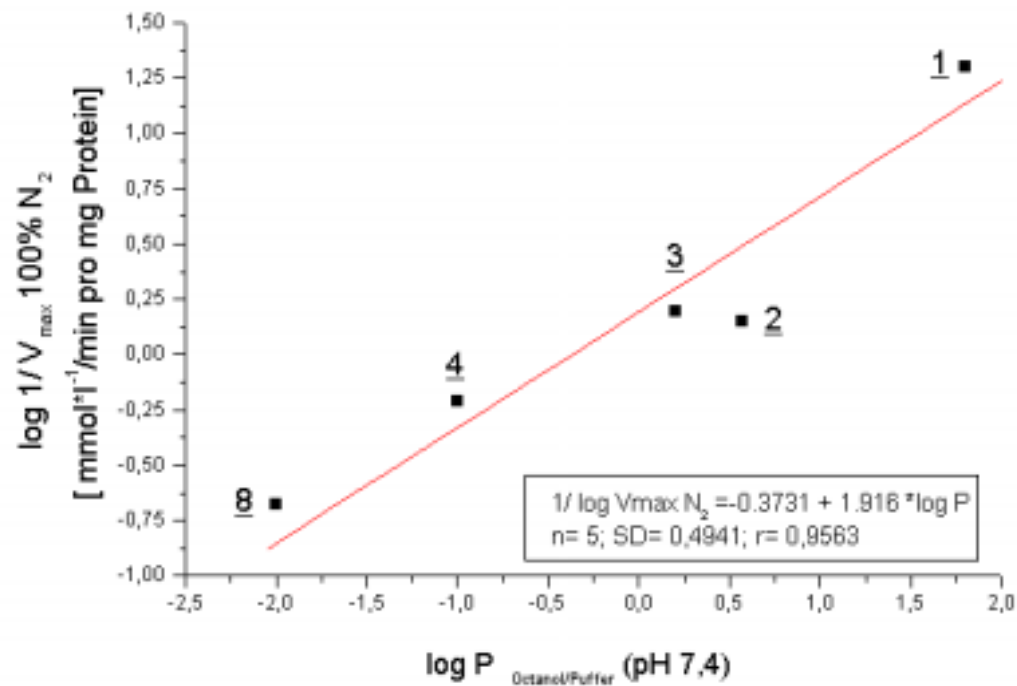
Reduktionsverhalten der Nitroxide in mitochondrialen Komponenten untersucht. Von den Stoffeigenschaften der untersuchten Verbindungen sollte besonders die Lipophilie und damit das Distributionsverhalten der Nitroxide von Bedeutung sein, da das mitochondriale Ubichinon-Ubihydrochinon-System ebenfalls sehr lipophil, und somit innerhalb der Membran lokalisiert ist.

Um die Ergebnisse der Reduktionsuntersuchungen in dieser Hinsicht interpretieren zu können, wurden die gewonnenen Daten, V_{\max} - und K_m -Werte als Zielgröße, mit den Parametern P und $E_{1/2}$ als Einflußgröße, mit Hilfe der Regressionanalyse untersucht. So zeigt die Abbildung 97 die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} der mitochondrialen Reduktion der Piperidinnitroxide in Abhängigkeit vom Lipid/ Wasser-Verteilungskoeffizienten P der eingesetzten Verbindungen.

Ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,956$ (unter Stickstoffatmosphäre) bzw. $r = 0,922$ (unter Sauerstoffatmosphäre) liefert eine deutliche Abhängigkeit der maximalen Reduktionsgeschwindigkeit vom Verteilungskoeffizienten. Die Maximalgeschwindigkeit der Reduktion von Nitroxiden zu den korrespondierenden Hydroxylaminen in isolierten Mitochondrien wird somit weitgehend durch die Lipophilie der eingesetzten Verbindungen bestimmt. Hierbei werden durch den Octanol/ Puffer-Verteilungskoeffizient (P) in diesem Fall die biologischen Verhältnisse wesentlich besser widerspiegelt, als durch den Heptan/ Puffer-Verteilungskoeffizient, der mit $r = 0,88$ (unter Stickstoffatmosphäre) bzw. $r = 0,54$ (unter Sauerstoffatmosphäre) eine geringere bzw. keine Korrelation aufweist.

Beim Vergleich der V_{\max} - und K_m -Werte der mitochondrialen Reduktion von Piperidinnitroxiden mit den elektrochemisch gewonnenen Peakpotentialen (siehe Kapitel 5.2) sowie den chemischen Konstanten der Reduktion nach Ascorbinsäurezusatz (siehe Kapitel 5.3) konnte keine Abhängigkeit festgestellt werden.

A



B

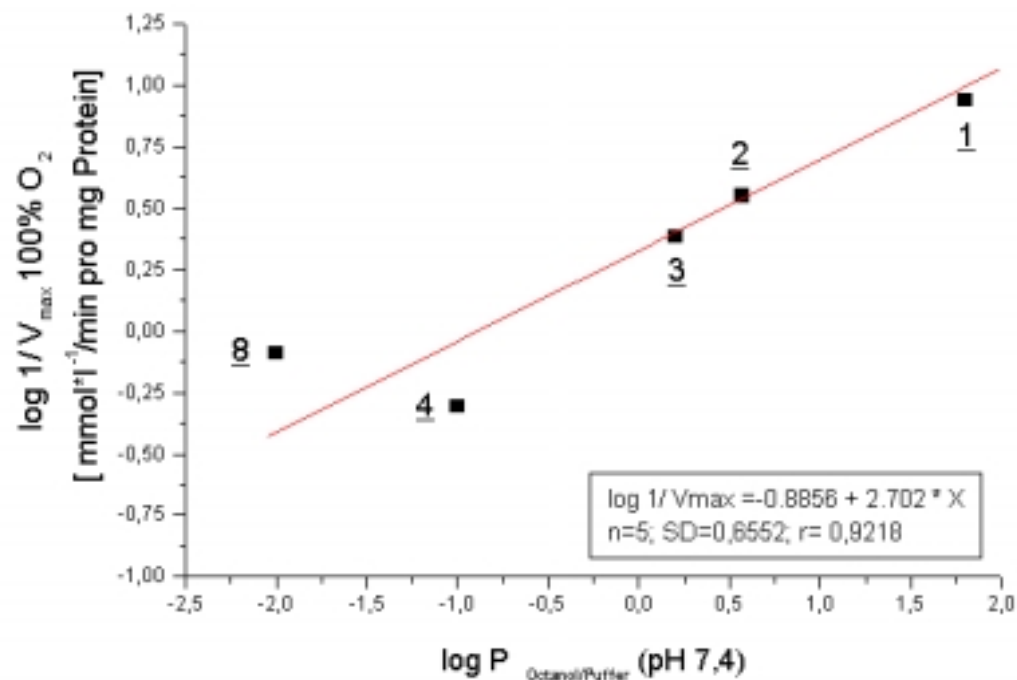


Abbildung 97: Regressionsanalyse zu den Einflußfaktoren auf das Reduktionsverhalten der untersuchten Nitroxide in isolierten Rattenlebermitochondrien: Einflußgröße: $P_{\text{Octanol/Puffer}}$ (pH 7,4); Zielgröße: V_{max} unter Stickstoff- (A) bzw. Sauerstoffatmosphäre (B).

6.6 Schlußfolgerungen der Untersuchungen zur In-vitro-Biotransformation

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen an Pilzen, subzellulären Systemen, intakten Zellen und isolierten Organen zur Metabolisierung von Nitroxiden haben die Befunde anderer Arbeitsgruppen insofern bestätigt, als daß der gebildete Hauptmetabolit der Nitroxide in der initialen Biotransformationsphase stets das korrespondierende Hydroxylamin ist. Dieser Reduktionsschritt kann, abhängig vom untersuchten biologischen System, auf enzymatischen oder nichtenzymatischen Wege erfolgen.

Als ein wichtiges Ergebnis konnte erstmalig die Bildung von sterisch gehinderten sekundären Aminen aus Piperidinnitroxiden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen werden. Die Entstehung von sekundären Aminen erfolgt dabei durch Thiolgruppen und ist unabhängig vom Cytochrom P-450. Während diese Reduktionsreaktion in Keratinozyten hauptsächlich in eine Richtung abläuft, erfolgt in isolierten Rattenlebermikrosomen und in der isoliert perfundierten Rattenleber gleichzeitig eine Reoxidation der sekundären Amine als Konkurrenzreaktion zur Reduktion der Nitroxide. In den mitochondrialen und zytosolischen Fraktion der Rattenleber konnte die Reoxidation von sekundären Aminen nicht nachgewiesen werden. Ein Redoxzyklus von Nitroxylradikalen, welcher sowohl Hydroxylamine als auch sekundäre Amine einschließt, erscheint somit im endoplasmatischen Retikulum der Rattenleber wahrscheinlich. Eine Beteiligung von Cytochrom P-450 bzw. der NADPH-abhängigen Cytochrom P-450-Reduktase ist anzunehmen, da diese Enzyme sowohl Oxidations- als auch Reduktionsreaktionen vermitteln können. Da diese Reduktionsreaktion in Keratinozyten enzymatisch abläuft und über Thiolgruppen vermittelt wird, ist eine Beteiligung des Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktasesystem wahrscheinlich. Hinweise in der Literatur deuten ebenfalls in diese Richtung [3, 132].

Weiterhin konnten erstmalig nachgewiesen werden, daß eine Metabolisierungsreaktion am Substituenten in 4-Position erfolgen kann. Aus der Literatur war bisher nur die einfache Hydrolyse von Esterstrukturen in vitro und in vivo bekannt. Die Ketofunktion von Nitroxid **3** (TEMPON) wird durch diese Reaktion reduktiv zur Hydroxylgruppe biotransformiert. Dieser Metabolisierungsschritt erfolgt ausschließlich in der zytosolischen Fraktion und wird über eine lösliche Ketoreduktase katalysiert. Eine Oxidation der Hydroxylfunktion konnte nicht festgestellt werden. Dieser Befund läßt sich, auf die sehr kleinen K_m -Werte der enzymatischen Reduktion durch Ketoreduktasen zurückführen. Die genaue Kenntnis der

Biotransformation von Nitroxid **3** ist insbesondere von Bedeutung, da diese Spinsonde in sehr vielen In-vitro- und In-vivo-ESR-Untersuchungen in der Literatur verwendet wurde und dabei eine Differenzierung zwischen Nitroxid **2** und **3** allein über die Hyperfeinkopplungskonstante a_N nur sehr schwer möglich war. Es ist somit anzunehmen, daß in vielen publizierten Arbeiten nicht das ESR-Signal von **3**, sondern das Signal von **2** bzw. ein überlagertes Signal beider Spezies detektiert wurde. Da sich diese Verbindungen in ihren physikochemischen Eigenschaften und Verteilungskoeffizienten unterscheiden, läßt sich die Validität einer Reihe dieser publizierten Untersuchungen in Frage stellen.

Obwohl in der Literatur mehrfach diskutiert, konnte in den vorliegenden Untersuchungen kein Beweis für die Bildung von Glucuronsäure- oder Schwefelsäurekonjugaten als Phase-II-Metaboliten während der Biotransformation von stabilen Nitroxylradikalen erbracht werden. Dies könnte auf die relative Größe der Glucuronsäure- bzw. Schwefelsäurereste zurückzuführen sein, da die NO-Gruppierung durch die benachbarten Methylgruppen sterisch sehr gut abgeschirmt wird und somit nur wenig Raum für eine Bindung zur Verfügung steht. Als einziger Phase-II-Metabolit wurde das Acetylderivat bei Piperidinnitroxiden nachgewiesen. Quantitativ war diese Biotransformationsreaktion aber ohne praktische Relevanz, da nur wenige Prozent, der jeweils eingesetzten Ausgangsverbindung in dieser Reaktion umgesetzt wurden.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Reduktionskinetik von verschiedenen Nitroxiden in Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln konnte der Einfluß von Sauerstoff auf das Reaktionsverhalten direkt nachgewiesen werden. Durch Einsatz mehrerer selektiver Atmungsketteninhibitoren gelang es, das Ubichinon-Ubihydrochinon-Redoxsystem als Reaktionspartner der Nitroxide zu favorisieren. Diese Erkenntnisse sind insofern neu, als daß die Beteiligung des Ubichinonsystems zwar schon länger in der Diskussion ist, eine Differenzierung zwischen der Rolle des Ubisemichinons und des Ubihydrochinons im Reaktionsgeschehen bisher nicht durchgeführt wurde. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen konnte ein neuer Reaktionsmechanismus für die mitochondriale Reduktion von Nitroxiden unter Beteiligung des Ubichinon-Ubihydrochinon-Redoxsystem postuliert werden.

Die Reoxidation der Hydroxylamine zu Nitroxiden durch Komponenten der Atmungskette konnte nachgewiesen werden. Hierbei fungiert mitochondrial freigesetztes Superoxid als Oxidationsmittel. Eine Beteiligung der Cytochrom-Oxidase an dieser Oxidationsreaktion wie

206

es in der einschlägigen Literatur mehrfach diskutiert und publiziert wurde [173], wird als unwahrscheinlich angesehen, da Cyanid, als ein sehr effektiver Inhibitor der Cytochromoxidase, die Nitroxylradikalbildung stimuliert und nicht, wie dann zu erwarten wäre, hemmt. Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse konnte der Nachweis erbracht werden, daß die Reoxidation der diamagnetischen Hydroxylamine unter notweniger direkter bzw. indirekter Beteiligung der Atmungskette erfolgt.

7 In-vitro-Proteinbindung von Nitroxylradikalen

Der erste Nachweis eines ESR-Signales von Nitroxylradikalen unter In-vivo-Bedingungen liegt bereits über 20 Jahre zurück [198]. Seither wurde eine Vielzahl von Arbeiten publiziert, die das pharmakokinetische Verhalten von Nitroxiden, vorzugsweise in niedrigen Frequenzbereichen wie L-Band [199], S-Band [200, 201, 202] und X-Band [203, 204], zum Gegenstand haben. Parallel zur klassischen ESR-Spektroskopie wurden aber kaum chromatographische Methoden eingesetzt und eine systematische Erfassung pharmakokinetischer Basisparameter, wie z.B. der In-vitro-Proteinbindung, erfolgte bisher nicht. Derartige Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Spinsonden sind aus pharmazeutischer Sicht von besonderem Interesse, da sich durch Einsatz dieser Verbindungen neue Möglichkeiten zur nichtinvasiven Untersuchung von "gelabelten" Arzneistoffen und Arzneiträgern ergeben [205].

In-vitro-Bestimmung der Proteinbindung.

Die Bindung an Plasmaproteine beeinflusst wesentlich das pharmakokinetische Verhalten von Arzneistoffen sowie den für einen pharmakologischen Effekt zur Verfügung stehenden ungebundenen Arzneistoffanteil. Darüber hinaus kann eine starke Proteinbindung zusätzliche analytische Probleme aufwerfen, da die Wiederfindungsraten von Arzneistoffen bei der Probenvorbereitung negativ beeinflusst werden. Trotz der breiten Anwendung von Nitroxylradikalen für In-vivo-ESR-Untersuchungen, liegen keine Literaturinformationen zur Wechselwirkung mit Plasmaproteinen vor [206].

Eine gute Abschätzung des Ausmaßes der Proteinbindung kann durch die In-vitro-Bestimmung der Affinität zu Serumalbumin erhalten werden, da dieses Protein mit einer Plasmakonzentration von 4 % ungefähr 50 % des gesamten Plasmaproteinanteils ausmacht. Weitere, für die Proteinbindung relevante Blutbestandteile, sind die Erythrocyten sowie die α_1 -Glykoproteine. Es ist auch zu berücksichtigen, daß die Bindung an Gewebeproteine verglichen mit der Bindung an Blutbestandteile eine größere Bedeutung für die Verteilung haben kann. Ursache ist aber nicht die höhere Affinität der Bindungsstellen, sondern die mengenmäßige Dominanz der Gewebeproteine.

Das für die Untersuchungen eingesetzte Humanserumalbumin wies eine relative Molmasse von $6,9 \cdot 10^4$ auf und war elektrophoretisch rein. Die In-vitro-Proteinbindung von Nitroxiden an Serumalbumin wurde mittels Ultrazentrifugation (Zentrifugal-Ultrafilter Centrisart® I mit einer Trennleistung von 20 kD) ermittelt. Die Konzentration der Nitroxide im wäßrigen Überstand (freies Nitroxide c_f) wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie bestimmt. Die Konzentration an

proteingebundenen Nitroxid c_g ergibt sich aus der Differenz aus der eingesetzten Gesamtnitroxidkonzentration c_{total} und der im Überstand vorhandenen Nitroxidkonzentration c_f . Das verwendete Albumin verfälscht die Quantifizierung der Nitroxide mittels ESR-Spektroskopie nicht, da es die Radikalfunktion nicht in ihren paramagnetischen Eigenschaften beeinflusst. Für die untersuchten Nitroxide wurde die prozentuale Proteinbindung an Serumalbumin bei einer Konzentration von $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle 36 zusammengefaßt aufgeführt.

Tabelle 36: In-vitro-Proteinbindung von Nitroxylradikalen an humanes Serumalbumin ($n = 6$; Konz.: $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; 5 $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; 9 $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

Substanz	Proteinbindung [%] (s _%)
<u>1</u>	23,1 (± 2,4)
<u>2</u>	1,4 (± 3,5)
<u>3</u>	1,9 (± 0,5)
<u>4</u>	10,3 (± 2,1)
<u>5</u>	89,1 (± 0,9)
<u>6</u>	6,4 (± 1,9)
<u>9</u>	0
<u>11</u>	0
<u>12</u>	0
<u>13</u>	2,8 (± 2,6)

Um Aussagen zur Anzahl der Bindungsstellen am Proteinmolekül (n) zu erhalten, wurde die Ausgangskonzentration der untersuchten Nitroxide in dem Bereich von $0,25\text{--}5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ variiert. Die Albuminkonzentration c_{Protein} wurde bei allen Untersuchungen mit 4% (entspricht $0,58 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bei einer mittleren molaren Masse von $6,9 \cdot 10^4$) konstant gehalten. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Beziehungen [207]. Der Parameter r , der der Anzahl der gebundenen Nitroxidmoleküle pro Proteinmolekül entspricht, wurde als Quotient aus c_g und c_{Protein} berechnet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 98 dargestellt.

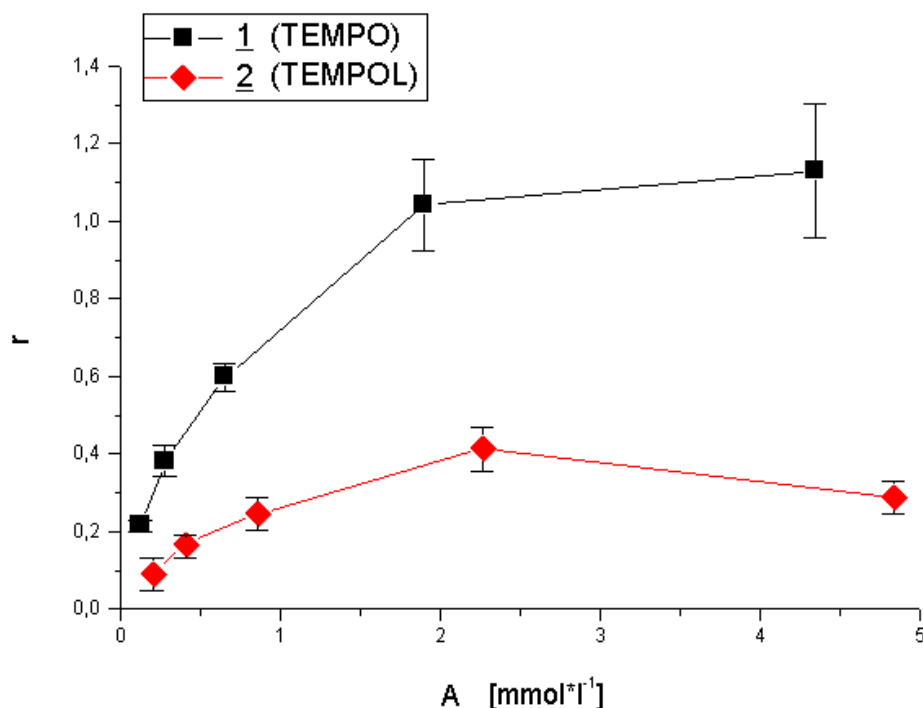


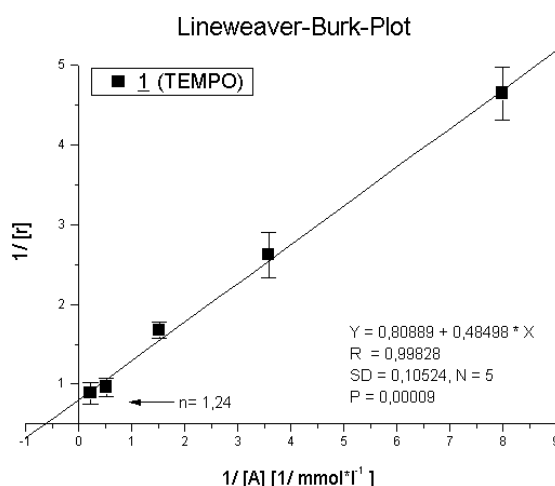
Abbildung 98: Gebundene Nitroxidmoleküle pro Serumalbuminmolekül in Abhängigkeit von der Konzentration der ungebundenen Verbindung (A) dargestellt für die Piperidinnitroxide **1** und **2** in isotonischem Phosphatpuffer (pH = 7,4 ; 37 °C). Die Kapazität der Proteinbindung ist trotz steigender Nitroxidkonzentration begrenzt.

Für die Piperidinnitroxide **1** und **2** wurden zur Ermittlung der Parameter der Proteinbindung die Werte im Lineweaver-Burk-Plot sowie in Scatchard-Beziehung dargestellt. Die Ergebnisse sind für Verbindung **1** in Abbildung 99 dargestellt.

Die aufgetragenen Werte von $1/r$ gegen die von $1/c_f$ ergeben nach Regression jeweils eine Gerade. Die vorhandenen Bindungsstellen des Proteins weisen somit nur geringe Affinitätsunterschiede auf. Die Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül betragen, ermittelt aus der Scatchard-Plot-Beziehung, für Nitroxid **1** $n = 1,24$ und für **2** $n = 0,45$. Eine unspezifische Anlagerung der Nitroxide nach Absättigung der Bindungsstellen mit hoher Affinität konnte nicht nachgewiesen werden.

Vergleichende Untersuchungen zur Proteinbindung unter Verwendung des Vollbluts von Ratten (unter Zusatz von Heparin) ergaben höhere prozentuale Proteinbindungen. Die Quantifizierung des freien Nitroxidanteils wurde ebenfalls mit Hilfe der ESR-Spektroskopie durchgeführt. Da eine nichtenzymatische Reduktion der Nitroxylgruppe bzw. eine Reduktion innerhalb der Erythrozyten bzw. anderer Blutzellen nicht auszuschließen ist [208], ist die Validität dieser Ergebnisse jedoch noch nicht endgültig gesichert.

A



B

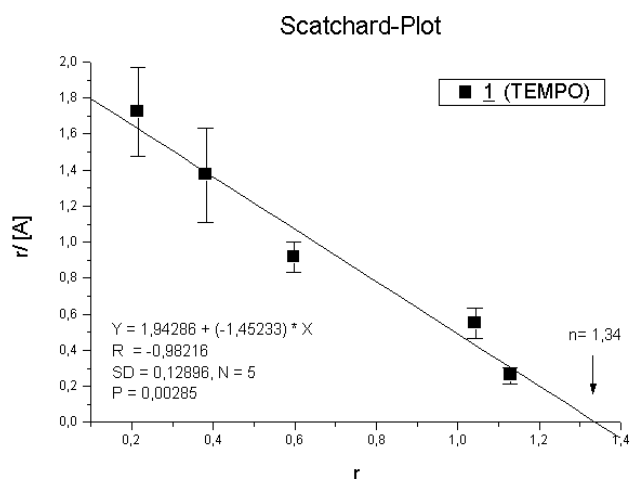


Abbildung 99: Bestimmung der Parameter für die Proteinbindung von Verbindung **1** dargestellt als Lineweaver-Burk-Plot (A) und als Scatchard-Plot (B). Die Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül beträgt für 1,24 für Nitroxid **1**.

Schlußfolgerungen

Die untersuchten Nitroxylradikale besitzen unterschiedliche Affinitäten zu humanen Serumalbumin, wobei in erster Linie die Ringstruktur und der Substituenteneinfluß für das Ausmaß der Proteinbindung von Bedeutung sind. Eine direkte Beziehung zwischen dem Ausmaß der Proteinbindung und der Lipophilie der Verbindungen konnte nicht eindeutig belegt werden. Für den künftigen Einsatz von Spinsonden im Rahmen pharmakokinetischer Arbeiten ist der Unterschied in der Proteinbindung des Benzoessäureesters **5** und des freien Nitroxides **2** von besonderer Wichtigkeit, da bei ähnlichen ESR-Signalen, aufgrund von Veränderungen pharmakokinetischer Kenndaten u.U. falsche Schlußfolgerungen aus den ESR-Daten gezogen werden können.

8 Einsatzmöglichkeiten von Nitroxylradikalen im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Fragestellungen

Die ESR-Spektroskopie hat in den letzten Jahren eine wachsende Bedeutung in der internationalen medizinisch-biologischen und pharmazeutisch-technologischen Forschung erlangt. Dies ist insbesondere auf die verbesserte Anpassung der ESR-Spektrometer an die biologischen Untersuchungssysteme, und das zunehmende Interesse an nichtinvasiven In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zurückzuführen. Weiterhin können durch ESR-Tomographie paramagnetische Spezies bezüglich ihrer Natur differenziert und orts aufgelöst nachgewiesen werden [209].

In dem folgenden Kapitel werden einige neue Beispiele Einsatzmöglichkeiten für Nitroxide dargestellt. Dabei werden die großen Potenzen von Nitroxylradikalen im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen dargestellt und diskutiert.

8.1 pH-Messung mittels pH-sensitiver Imidazolnitroxylradikale

Die Bestimmung von pH-Werten ist für die Aufklärung von Stabilitätsfragen vieler Arzneistoffe und damit auch für veränderte biopharmazeutische Parameter (z.B. eingeschränkte Bioverfügbarkeit durch Hydrolyse von Arzneistoffen mit Ester- oder Säureamidstruktur) von großem Interesse [210]. Bei der Untersuchung von transparenten flüssigen Zubereitungen bereitet dies bekanntermaßen durch Einsatz entsprechend kalibrierter Glaselektroden keine Probleme. Soll aber z.B. der Einfluß eines Sterilisationsverfahrens auf den pH-Wert einer wäßrigen Injektionslösung in einer verschmolzenen Glasampulle untersucht werden, so ist dies auf zerstörungsfreiem Wege mit der Glaselektrode nicht mehr möglich. Besondere Probleme bereitet auch die Erfassung des pH-Wertes in halbfesten nichttransparenten Systemen [211], wie sie z.B. W/O-Emulsionen darstellen und festen Arzneiträgern [212]. Bisher wurden z.B. diese W/O-Emulsionen nach Zugabe von Wasser und Rühren gebrochen und anschließend der ursprüngliche pH-Wert der inneren Phase aus dem mittels Glaselektrode gemessenen pH-Wert, der nun äußeren Phase berechnet [213]. Die Problematik einer solchen pH-Messung hinsichtlich ihrer Validität ist offensichtlich. Weitere Schwierigkeiten bestehen auch in der pH-Messung an Körperoberflächen oder in Körperhöhlen, die trotz Entwicklung spezieller Elektroden z.Z. noch nicht beseitigt worden sind [214].

Neben der ^{31}P -NMR-Methode, die für pH-Messungen etwas weniger empfindlich ist [215, 216], bietet die ESR-Methode, durch den Einsatz pH-sensitiver Spinsonden mit

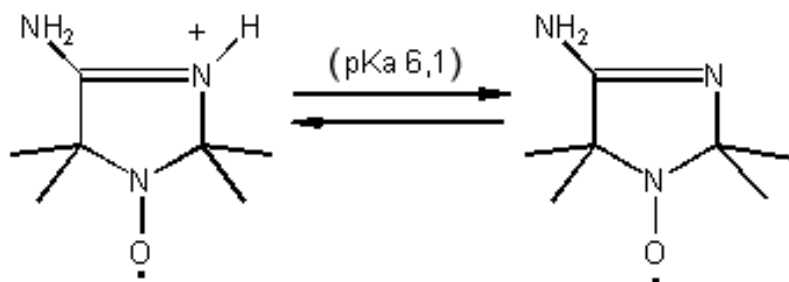
bekannten pK_a -Werten die Möglichkeit, den pH-Wert spektroskopisch, zerstörungsfrei und in situ zu erfassen.

8.1.1 Methodenentwicklung und Kalibrierung

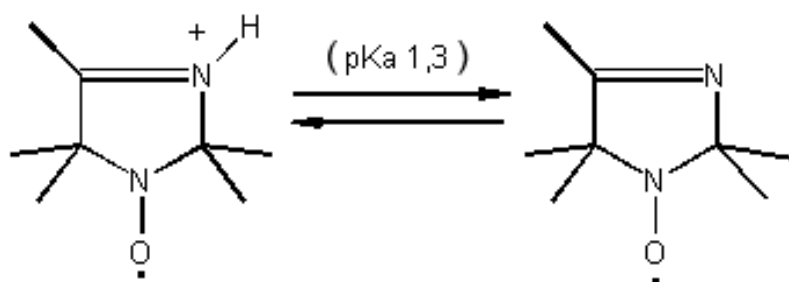
Die Möglichkeit der pH-Wertbestimmung mit Hilfe von Nitroxylradikalen und der ESR-Spektroskopie ist seit Jahren bekannt [217], wobei sie durch die Synthese von pH-sensitiven Imidazolnitroxiden noch wesentlich vereinfacht werden konnte [218, 219, 220, 221]. Während bisher solche Messungen, wie z.B. an biologischen Membranen, nur durch Verteilungsuntersuchungen von Sonden mit protonierbar bzw. deprotonierbaren Gruppen möglich waren, bei denen vorzugsweise die Piperidinnitroxide **4** und **6** sowie das Pyrrolidinderivat **9** eingesetzt wurden [222], kamen im Rahmen der vorliegenden Arbeit Imidazolin- und Imidazolidinnitroxide zum Einsatz. Dies waren die Derivate **11** (4-Amino-2,2,5,5-teramethyl-imidazolin-1-oxyl) und **13** (2,2,3,5,5-Pentamethyl-imidazolin-1-oxyl) als Imidazolinderivate und **12** (2,2,3,4,5,5-Hexamethyl-imidazolidin-1-oxyl) mit Imidazolidinstruktur. Die Strukturformeln und die pK_a -Werte der Verbindungen sind in Abbildung 100 dargestellt.

In Abhängigkeit von der Protonenkonzentration liegen diese Nitroxide entsprechend ihres pK_a -Wertes entweder protoniert oder deprotoniert vor. Normalerweise kann das ungepaarte Elektron der NO-Gruppe sowohl am Sauerstoff als auch am Stickstoff lokalisiert sein. Es sind somit zwei Grenzfälle denkbar, wobei die Lage dieses Gleichgewichtes durch die äußeren Bedingungen bestimmt wird. Auf diesem Effekt beruht das Prinzip der Polaritätsmessung mittels ESR. In einer polaren wässrigen Umgebung ist die Lokalisierung am Stickstoff bevorzugt. Durch die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit dem Kernspin des Stickstoffs kommt es zu einer charakteristischen Aufspaltung des ESR-Signals, im Falle von ^{14}N mit $I = 1$ entsteht so ein Triplett, wobei die Größe der Hyperfeinkopplungskonstante a_N durch die Intensität der Wechselwirkung von Elektronen- und Kernspin bestimmt wird. Wird der Stickstoff in 3-Position des Imidazolgrundkörpers protoniert, erfolgt eine charakteristische Änderung der Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit den Bestandteilen der Molekülstruktur. Die Wechselwirkung mit dem Stickstoff in 1-Position nimmt ab und damit verringert sich die Hyperfeinkopplungskonstante a_N . Eine pH-Messung, vergleichbar mit der Glaselektrode, wird im Bereich von maximal ± 2 pH-Einheiten des jeweiligen pK_a -Wertes der jeweiligen Spinsonde möglich (Abbildung 101).

11



12



13

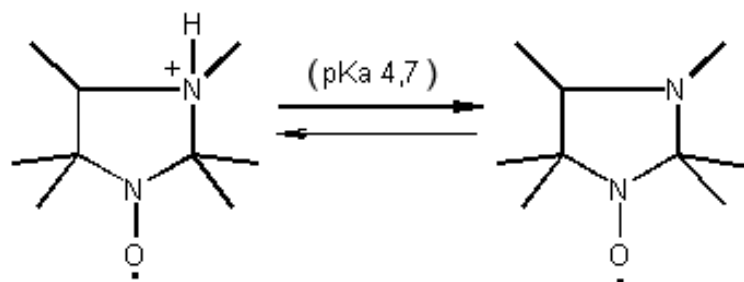


Abbildung 100: Protonierte und deprotonierte Form (mit pK_a-Wert) der pH-sensitiven Nitroxide mit Imidazolin- und Imidazolidinstruktur.

Eine pH-Messung in größerem Abstand zum pK_a-Wert ist, wie von anderen Arbeitsgruppen bereits publiziert [223], demzufolge sehr kritisch zu bewerten. Bei einem Abstand von drei pH-Einheiten beträgt nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung das Verhältnis der beiden Nitroxidformen schon 1:1000, und eine Änderung der Hyperfeinkopplungskonstante ist praktisch nicht mehr meßbar.

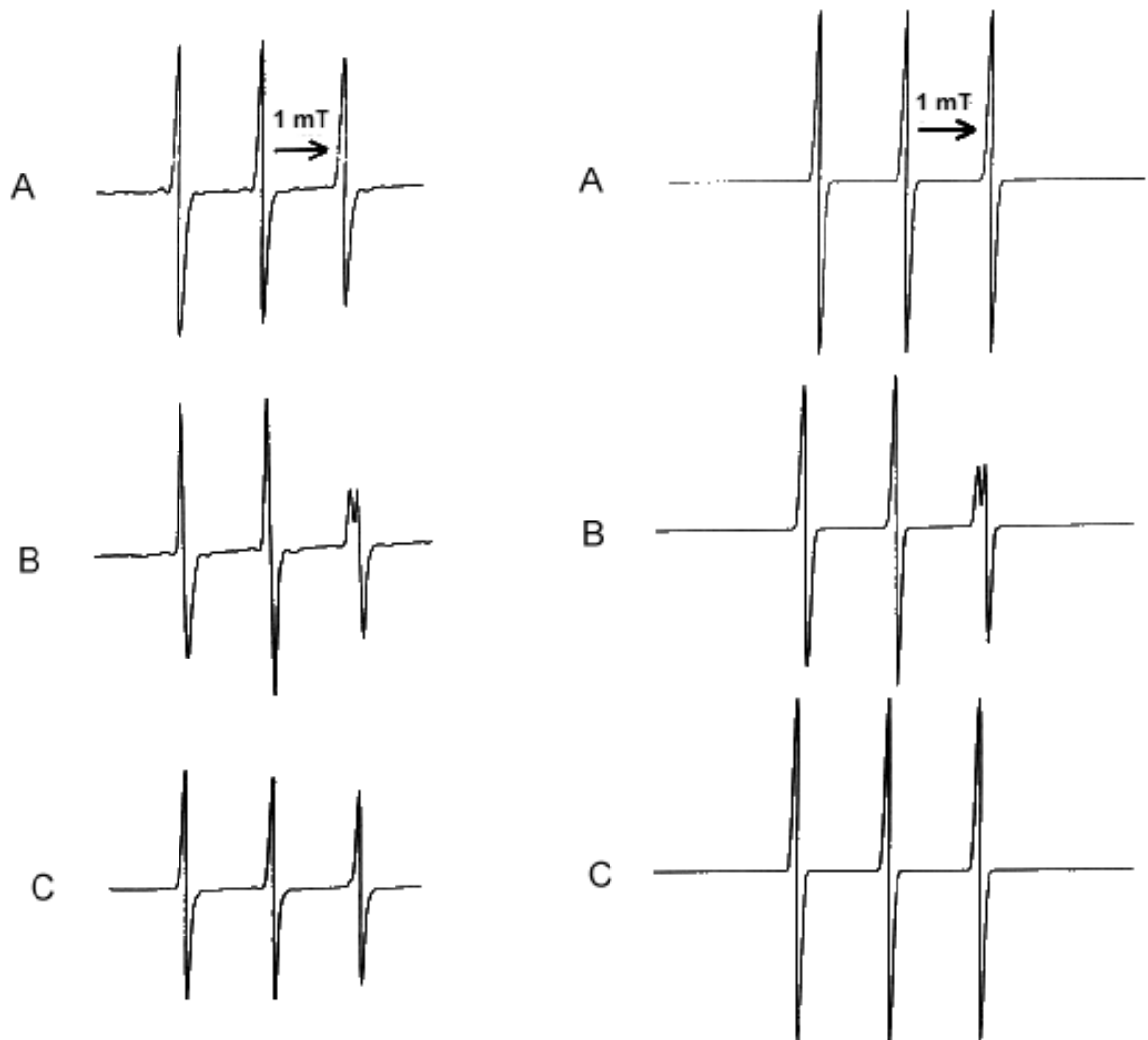
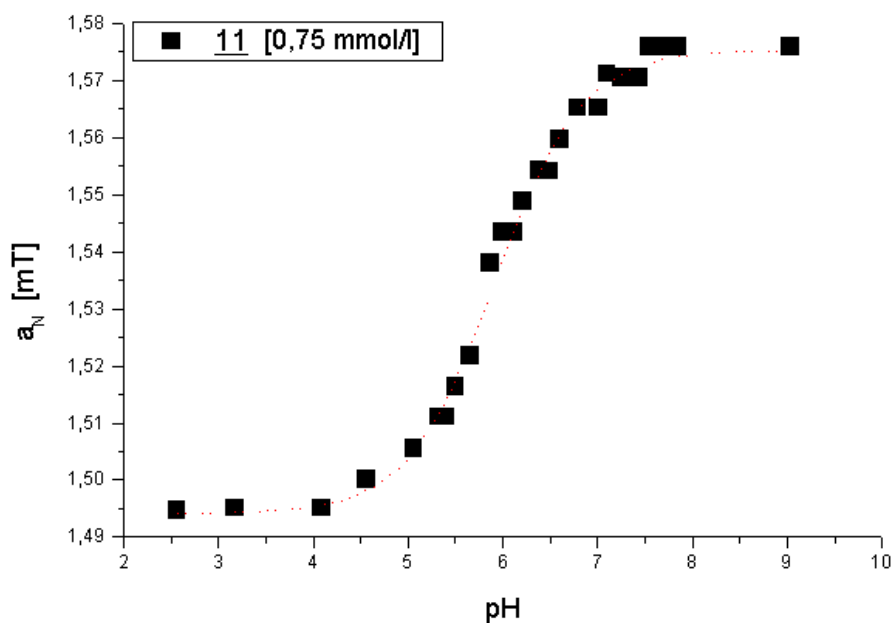


Abbildung 101: Experimentelle (I) und simulierte ESR-Spektren (II) des Imidazolinnitroxides **11** in Pufferlösung: (A) pH = 8.00, (B) pH = 6.39 und (C) pH = 4.10 Abbildung übernommen aus Kroll et al. [4]).

Für die pH-Messungen wurden Pufferlösungen (Britton-Robinson-Puffer, pH-Wert eingestellt mit Natronlauge) hergestellt und die tabellierten pH-Werte durch Messungen mit der Wasserstoffelektrode überprüft. Die folgende Abbildung 102 zeigt die erstellten Kalibrierungskurven über die Hyperfeinkopplungskonstante a_N des gemessenen ESR-Signals für pH-sensitiven Spinsonden **11** und **13**.

A



B

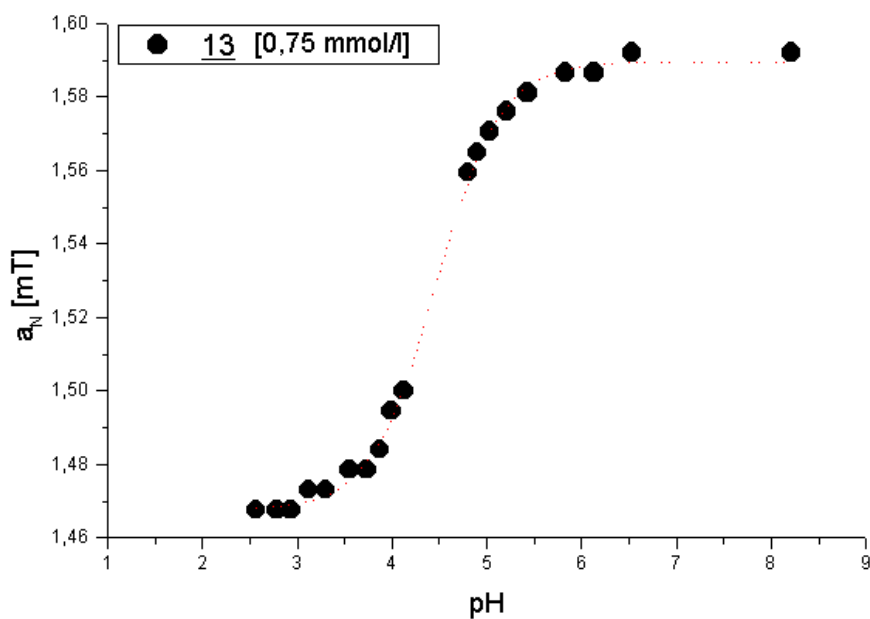


Abbildung 102: pH Kalibrierkurven für Spinsonde **11** (A) und Spinsonde **13** (B) über die Stickstoff-Hyperfeinkopplungskonstante a_N des gemessenen ESR-Signals.

Die Meßergebnisse belegen, daß über die Änderung der Hyperfeinkopplungskonstante a_N im ESR-Signal des Nitroxylradikals eine pH-Bestimmung mit einer Meßgenauigkeit von ca. 0,02

pH-Einheiten (pH-Bereich ca. ± 2 vom pK_a -Wert der Verbindung) möglich ist.

Im Bereich von maximal ± 1 pH-Einheiten vom pK_a Wert ist dagegen zusätzlich eine pH-Wertmessung über einen Intensitätsvergleich (bzw. Simulation) der ESR-Signale von protonierter und nichtprotonierter Form möglich. In diesem engen Bereich ist eine solche Vorgehensweise genauer (0,01 pH-Einheiten) als eine Bestimmung der Hyperfeinkopplungskonstante a_N , da der Sprung in der Änderung von a_N sehr ausgeprägt ist und das Intensitätsverhältnis dann genauer bestimmbar ist.

8.1.2 pH-Messung in wäßrigen Systemen

Die pH-Wertmessung in wäßrigen Systemen ist normalerweise ohne größere Schwierigkeiten durchführbar. Probleme bereitet die pH-Bestimmung nur dann, wenn die Messung direkt in einem verschlossenen Gefäß, z.B. einer zugeschmolzenen Glasampulle, durchgeführt werden soll. Dies kann bei der Beurteilung des Einflusses verschiedener Glasqualitäten auf die Freisetzung von Hydroniumionen während der Dampfsterilisation von Interesse sein. Ob dieser pH-Abfall auf Ionenaustausch zwischen Alkali-Ionen und Hydronium-Ionen, der gequollenen Glasoberfläche [224] oder auf gelöstes CO_2 [225] zurückzuführen ist, wird in der Literatur noch kontrovers diskutiert. Es ist bisher unstrittig, daß dieser pH-Abfall für die Stabilität, wie z.B. von Thiosulfatlösungen, von großer Bedeutung ist [226].

In den folgenden durchgeführten Untersuchungen sollte am Beispiel der Dampfsterilisation von Ampullen, die Lösungen verschiedener hydrolyseempfindlicher Lokalanästhetika und eine pH-sensitive Spinsonde enthielten, die Möglichkeiten der pH-Messungen mittels ESR-Spektroskopie demonstriert werden.

Es wurden 0,5%ige Lösungen der Lokalanästhetika hergestellt, welche die Spinsonde **11** ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) enthielten. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 0,1 N Natronlauge exakt auf 7,4 eingestellt, wobei die verwendete Glaselektrode mit der Wasserstoffelektrode kalibriert wurde. Die Untersuchungslösungen wurden in Ampullen mit 2 ml Fassungsvermögen gefüllt, die Lösungen 5 min intensiv mit Argon gespült und der pH-Wert nochmals mittels Glaselektrode überprüft. Die Ampullen wurden verschmolzen und bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde die Hälfte der Proben dampfsterilisiert (15 min, 121 °C gesättigtem und gespannten Wasserdampf). Alle Proben wurden direkt mittels ESR vermessen. Die Ampullen wurden anschließend geöffnet, und der pH-Wert wurde mit Hilfe einer kalibrierten Glaselektrode bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 37 zusammengefaßt.

Tabelle 37: Vergleich der mittels ESR- und Glaselektrode gemessenen pH-Werte nach Dampfsterilisation von verschiedenen Lokalanästhetikaampullen.

Arzneistoff	pH (vorher) ESR	pH (nachher) ESR	pH (vorher) Glaselektrode	pH (nachher) Glaselektrode
Procain	7,38	< 5 ¹	7,40	4,67
Benzocain	7,38	< 5 ¹	7,40	4,32
Tetracain	7,40	< 5 ¹	7,40	4,89
Lidocain	7,37	6,90	7,40	6,88

¹ die pH-Werte liegen außerhalb der Kalibrierfunktion bei Verwendung der Sonde **11**

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, daß mit Hilfe der ESR-Spektroskopie, unter Einsatz von pH-sensitiven Nitroxiden, pH-Wert-Erfassungen auch in verschlossenen Gefäßen oder Abpackungen zerstörungsfrei möglich sind.

8.1.3 pH-Messung in nichttransparenten Systemen

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnt, bereitet auch die konventionelle Erfassung des pH-Wertes mittels Glaselektrode in halbfesten nichttransparenten Systemen, wie sie z.B. W/O-Emulsionen darstellen, und festen Arzneiträgern besondere Probleme. Inwieweit solche pH-Messung wirklich den ursprünglichen pH-Wert im Untersuchungssystem erfassen, bleibt fraglich. Mit den folgenden Untersuchungen sollte gezeigt werden, daß eine pH-Messung mittels ESR-Spektroskopie in nichttransparenten Systemen zerstörungsfrei möglich ist.

Hierzu wurde die Spinsonde **11** (0,4 ml Sondenlösung **11** mit einer Konzentration von 1 mmol·l⁻¹; pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf pH= 7 eingestellt) in Eucerinum[®] anhydricum (1g) eingearbeitet. Um nachzuweisen, daß die verwendete Spinsonde ausschließlich in der wäßrigen Phase, der so hergestellten W/O-Emulsion vorliegt, wurde die Sonde ebenfalls in die flüssige Lipoidgrundlage bei 50°C inkorporiert und mittels ESR-Spektroskopie untersucht (siehe Abbildung 103).

Das ESR-Spektrum zeigt in beiden Fällen nur jeweils ein breites Signal einer immobilen Spezies, dessen Form überwiegend durch Spinaustausch bestimmt wird. Somit waren keine Unterschiede zwischen der so inkorporierten Sonde und der reinen Spinsonde nachweisbar, so daß in der W/O-Emulsion eine Distribution der Verbindung von der wäßrigen in die Lipoidphase des Untersuchungssystems ausgeschlossen werden kann.

Wie die folgende Abbildung 104 belegt, wurde in der untersuchten W/O-Kontrollemulsion bei ausschließlichem Zusatz des entsprechenden Nitroxid über einen Zeitraum von 4 Wochen keine Veränderung des pH-Wertes beobachtet.

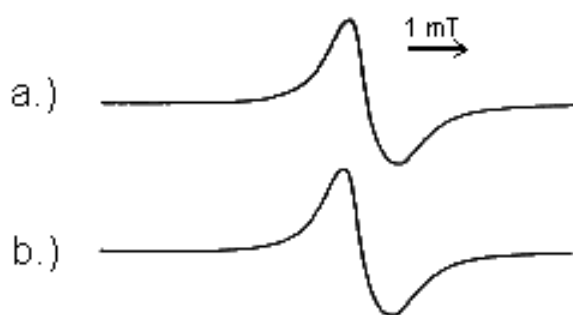


Abbildung 103: ESR-Spektren von Verbindung 11: a.) ungelöste, feste Probe und b.) 11 dispergiert in wasserfreiem Eucerinum® (erhitzt auf 50°C und abgekühlt auf Raumtemperatur unter 10 min. Rühren).

Anschließend wurden Untersuchungen an W/O-Emulsionen unter Zusatz des pH-sensitiven Nitroxids 11 mit zwei leicht hydrolysierbaren Modellarzneistoffen, dem Lokalanästhetikum Benzocain und dem Cyclooxygenasehemmer Acetylsalicylsäure (ASS) durchgeführt (siehe Abbildung 104).

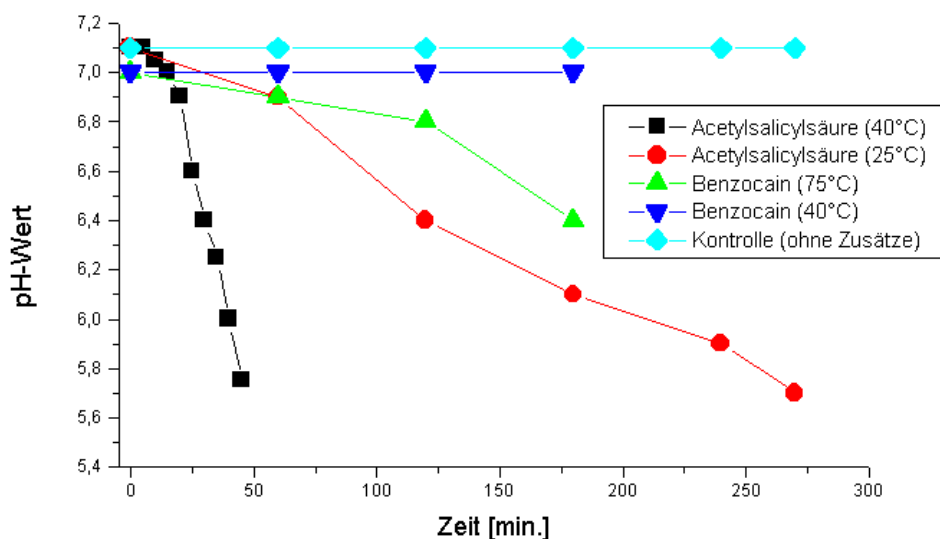


Abbildung 104: pH-Wertveränderungen durch hydrolyseempfindliche Modellarzneistoffe in der Wasserphase (mit 0,1 N NaOH auf pH 7 eingestellt) einer W/O-Emulsionen gemessen mit Hilfe der pH-sensitiven Imidazolspinsonde 11 ($pK_a = 6,1$) über die Änderung der ESR-Hyperfeinkopplungskonstante a_N .

Die Lösungen der Modellarzneistoffe und Nitroxid 11 (0,4 ml 1%ig, neutralisiert mit 0,1 N

NaOH auf pH= 7; versetzt mit Spinsondenlösung 11, 1 mmol·l⁻¹) wurden mittels Fantaschale und Pistill in 1g Eucerinum® anhydricum inkorporiert, bei definierten Temperaturen gelagert und in bestimmten Zeitabständen mit der ESR vermessen. Über die obigen Kalibrierkurven wurde der pH-Wert bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

Im Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt der sehr leicht hydrolysierbare Ester Acetylsalicylsäure bei 25°C eine starke pH-Wertverschiebung, während beim Benzocain erst bei 75°C eine Abnahme des pH-Wertes meßbar ist. Hiermit wird deutlich, daß die pH-Werterfassung mittels ESR-Spektroskopie eine geeignete Methode zur Untersuchung von hydrolytischen Prozessen mit pH-Verschiebungen in nichttransparenten Systemen ist.

8.1.4 Diskussion der pH-Messungen mittels ESR

Die Modelluntersuchungen zur Stabilität von hydrolyseempfindlichen Lokalanästhetika in wäßriger Wollwachsalkoholsalbe zeigten, daß mittels ESR-Spektroskopie eine kontinuierliche Erfassung der pH-Wertänderungen in nichttransparenten W/O-Systemen möglich ist. Artefakte, wie sie bei herkömmlich genutzten Methoden während der analytischen Vorbereitung oder durch unvollständige Erfassung der wäßrigen Komponente möglich sind, können durch die Anwendung von ESR-spektroskopischen Methoden ausgeschlossen werden.

Weitergehende Untersuchungen von *Mäder et al.* [227, 228] an Polymerfolien und biologisch abbaubaren Polymeren belegen, daß die Bestimmung des pH-Wertes mittels ESR-Spektroskopie auch in festen Trägersystemen ohne weitere Probenaufarbeitung möglich ist und dadurch neue Erkenntnisse, z.B. zur Stabilität und Biodegradation dieser zukunftssträchtigen Trägersysteme geliefert werden können. Weitere Untersuchungen zu dieser Problematik erscheinen sinnvoll, da zunehmend auch nichtinvasive pH-Messungen in komplexen biologischen Systemen von Interesse sind [229, 245].

8.2 Orientierende Untersuchungen zur Integrität, Penetration und Permeation von Liposomen an isolierter Haut sowie zum Einfluß von Enhancer auf die Penetration mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und ESR-Tomographie

Durch ESR-Imaging und lokalisierte ESR-Spektroskopie lassen sich paramagnetische Verbindungen bezüglich ihrer Natur differenzieren und orts aufgelöst nachweisen. Hierbei können neben kinetischen Fragestellungen auch biopharmazeutische Basisparameter, wie Mikroviskosität, Mikropolarität, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck, untersucht und bestimmt werden. Durch Einsatz der ESR-Tomographie bei verschiedenen Meßfrequenzen war es außerdem möglich, die Signale orts aufgelöst mit einer Auflösungsgrenze von z.Z. ca. 5- 10 μm im X-Band und ca. 100 μm im S-Band zu erfassen (vorausgesetzt sehr schmale ESR-Linien). Weiterhin konnten einige Autoren, wie *Freisleben et al.* [230] und *Michel et al.* [231] zeigen, daß sich bei Anwendung der X-Band-ESR-Tomographie die Penetration von spinmarkierten Arzneistoffen in die isolierte Haut haarloser Mäuse nichtinvasiv und orts aufgelöst erfassen läßt. Ungeachtet ihrer Potenzen wird die ESR-Spektroskopie und -Tomographie für pharmazeutisch-technologische und biopharmazeutische Fragestellungen international bisher nur wenig genutzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun an ausgewählten Beispielen untersucht, inwieweit unter Einsatz von Nitroxylradikalen und ESR-spektroskopischen bzw. -tomographischen Methoden neue Untersuchungen zur Integrität, Penetration und Permeation von Liposomen, nach Applikation auf isolierter Haut, möglich sind.

Liposomen stellen Vesikel mit einem Durchmesser von 25 bis 5000 nm dar, in deren Innenraum amphiphile oder hydrophile Arzneistoffmoleküle inkorporiert werden können [232, 233]. Die Membran kann aus einer (unilamellare Vesikel) oder mehreren Doppelschichten (multilamellare Vesikel) bestehen. *Mezei et al.* [234] berichteten 1980 erstmals über den positiven Effekt des Einsatzes von Liposomen auf die Penetration von Triamcinolonacetonid. Trotz einer Vielzahl an verfügbaren Untersuchungsergebnissen und Veröffentlichungen wird das Potential der Liposomen als Arzneistoffträger in der Dermatologie [235] bisher nur ansatzweise ausgenutzt, da eine Vielzahl von Fragen noch nicht abschließend geklärt sind [236, 237]. So ist insbesondere die Frage nach der strukturellen Integrität von Liposomen in der Haut von Interesse.

Es ist heute allgemein akzeptiert, daß in erster Linie die interzellulären Zwischenräume der obersten Hautschicht als Penetrationsweg für Liposomen in Frage kommen. Die aus Hautlipiden und Wasserbändern gebildeten Zwischenräume sind allerdings nur wenige μm

groß, so daß eine Penetration intakter Liposomen in der eingangs erwähnten Literatur häufig in Frage gestellt wurde (siehe Abbildung 105).

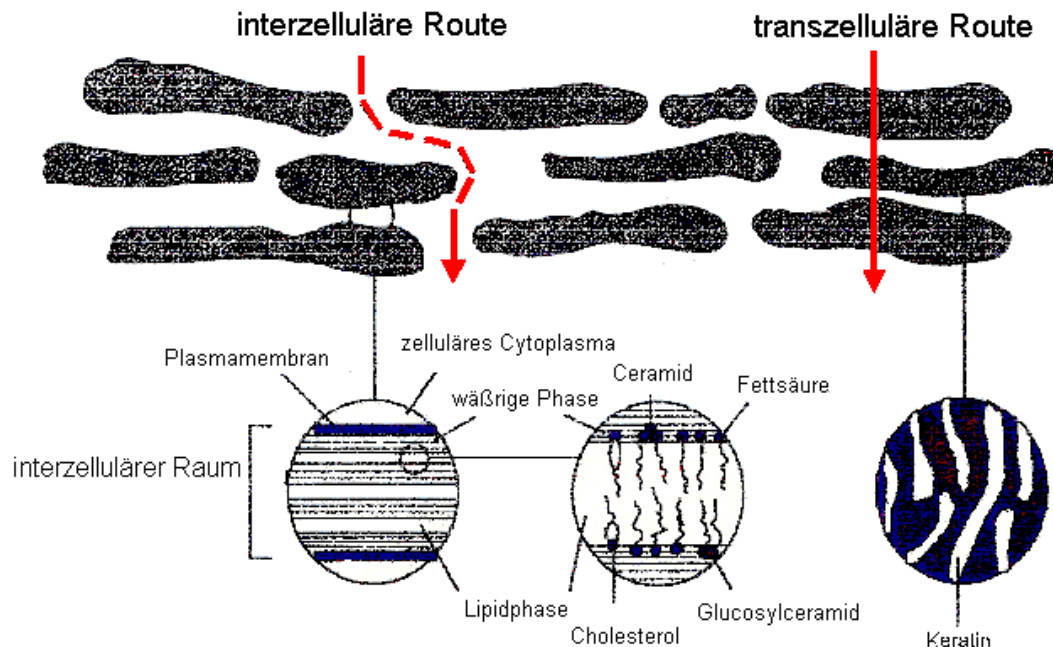


Abbildung 105: Aufbau des humanen Stratum corneum und mögliche Penetrationswege für Arzneistoffe und andere Xenobiotika (nach Barry [238]).

Untersuchungen mit Hilfe der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie konnten multilamellare Vesikel nach Applikation von Liposomen auch in tieferen Hautschichten nachweisen [239]. Arbeiten, in denen die Liposomengrundlage mit Fluoreszenzfarbstoffen und inkorporierte Corticoide radioaktiv markiert wurden, bestätigten die Penetration von Liposomenbestandteilen in tiefere Hautschichten [240, 241, 242]. Trotz dieser Untersuchungen konnte die Problematik der Stabilität und Penetration von Liposomen bisher nicht abschließend beantwortet werden. Da die obersten Hornschichtlagen nicht sehr fest miteinander verbunden sind, ist anzunehmen, daß Liposomenvesikel in diese Hautstrukturen eindringen können. Möglicherweise treten aber, die so in die oberen Hautschichten eingedrungenen Liposomen anschließend mit Hautlipiden in Wechselwirkung und dringen anschließend molekulardispers entlang der interzellulären Route in die Hornschicht ein. In bestimmten Bereichen der Hornschicht und der Epidermis kommt es zur Akkumulation von Liposomenbestandteilen und zur Ausbildung von vesikulären Strukturen, welche bei Anwendung invasiver und diskontinuierlicher Untersuchungstechniken eine Liposomenpenetration in die Haut vortäuschen können. Inwieweit Liposomen als

unverändertes und komplettes Vesikel in die Haut penetrieren, kann so z. Z. noch nicht beantwortet werden.

Die ESR-Spektroskopie und -Tomographie ist nun in der Lage, durch gezielte Inkorporierung von ESR-Spinsonden in die Vesikel [243], Informationen zur Integrität von Liposomen in der Haut auf nichtinvasivem Wege zu liefern. Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, die Möglichkeiten der S-Band-ESR-Spektroskopie und X-Band-ESR-Tomographie zur Bearbeitung dieser Fragestellung zu prüfen, und darüber hinaus erste Arbeiten mit multilamellaren Phosphatidylcholin-Liposomen durchzuführen.

8.2.1 Herstellung von Modell-Liposomen

Konventionelle Phosphatidylcholin-(PC)-Liposomen wurden unter Verwendung eines Ultraschallstabes hergestellt. Diese enthielten Nitroxid **6** als geladene und ESR-aktive Spinsonde (50 mmol·l⁻¹ in Phosphatpuffer, pH 9) (siehe Abbildung 106).

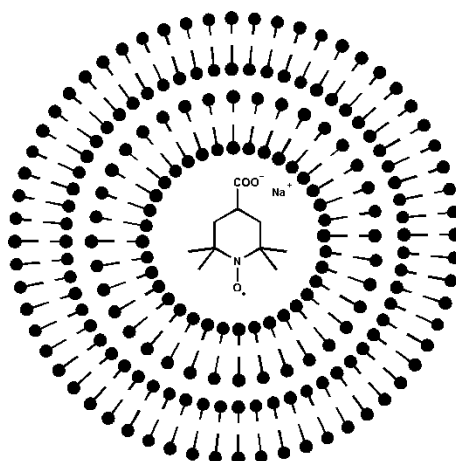


Abbildung 106: PC-Liposomen mit eingeschlossener Spinsonde **6** in Phosphatpuffer pH 9. Die Carboxylfunktion der Piperidinspinsonde ist unter diesen Versuchsbedingungen weitgehend deprotoniert und damit negativ geladen.

Die hergestellte Liposomenpräparation wurde mehrmals zentrifugiert und Pufferlösung (50 mmol·l⁻¹) resuspendiert (5•30 min mit 16000•g zentrifugiert; resuspendiert mit jeweils 50 ml und 2 min gemischt bei 2500 U/ min im Minishaker MS 1), um die nicht in den Liposomen inkorporierte Spinsonde zu entfernen.

Die hergestellten multilamellaren PC-Liposomen wurden mittels Laserdiffraktometrie^a (LD) und mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)^b analysiert. Der Durchmesser betrug durchschnittlich 500- 1000 nm, wobei die Vesikeldurchmesser (bedingt durch das Herstellungsverfahren) eine relativ breite Verteilung aufwiesen. Aufgrund der Größe, der so hergestellten Liposomen handelt es sich mit hoher Sicherheit um multilamellare Vesikel. Die liposomale Membran bestand aus Phosphatidylcholin (LIPOID E; Lipoid): Cholesterol : Tocopherol in einem Verhältnis von 28:5,8:1.

Die Stabilität der hergestellten Liposomen wurde durch LD-Messungen (nach 1, 3, 7 und 14 Tagen) sowie durch Reduktionsexperimente mittels Ascorbinsäure überprüft, da dieses Reduktionsmittel unter den Versuchsbedingungen (pH 9) nicht membranpermeabel ist und ausschließlich die freigesetzte Spinsonde reduziert. Ascorbinsäure (50 µl Liposomensuspension + 200 µl Ascorbinsäure 500 mmol•l⁻¹ in Phosphatpuffer mit pH 7) wurde zugesetzt und die Intensität der ESR-Signale jeweils mit und ohne Ascorbinsäurezusatz (Inkubationszeit 5 min, Zeitbereich von 10 min) bestimmt. Die Abnahme der ESR-Signalintensität zeigte eine Reduktion 1.Ordnung mit $k_{\text{Reduktion}} = 0,003 \text{ min}^{-1}$ und ist somit um eine Größenordnung langsamer als bei direkter Reaktion von Ascorbinsäure mit Nitroxid **6**. Der überwiegende Teil der eingearbeiteten Spinsonde scheint somit auch nach 7 Tagen noch vor einer schnellen Reduktion geschützt zu sein. Die langsame Abnahme der ESR-Signalintensität könnte durch eine Freisetzung der Spinsonde oder durch ein langsames Eindringen von Ascorbinsäure in die Liposomenmatrix zu erklären sein.

Die hergestellten Liposomen sind somit während der Untersuchungszeit (7 Tage) stabil. Die erhaltenen Ergebnisse der LD-Untersuchungen bestätigten diese Befunde, wobei aber zusätzlich ein geringes Größenwachstum der Vesikel (um 80 - 100 nm) festgestellt wurde. Die folgende Abbildung 107 zeigt nun die ESR-Spektren der verwendeten Spinsonde als Reinsubstanz und inkorporiert in verschiedenen Medien.

^a durchgeführt am Institut für Pharmazie I, Abt. Pharmazeutische Technologie der FU Berlin

^b durchgeführt am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps Universität Marburg

ESR-Spektren von Carboxy-TEMPO als Spinsonde

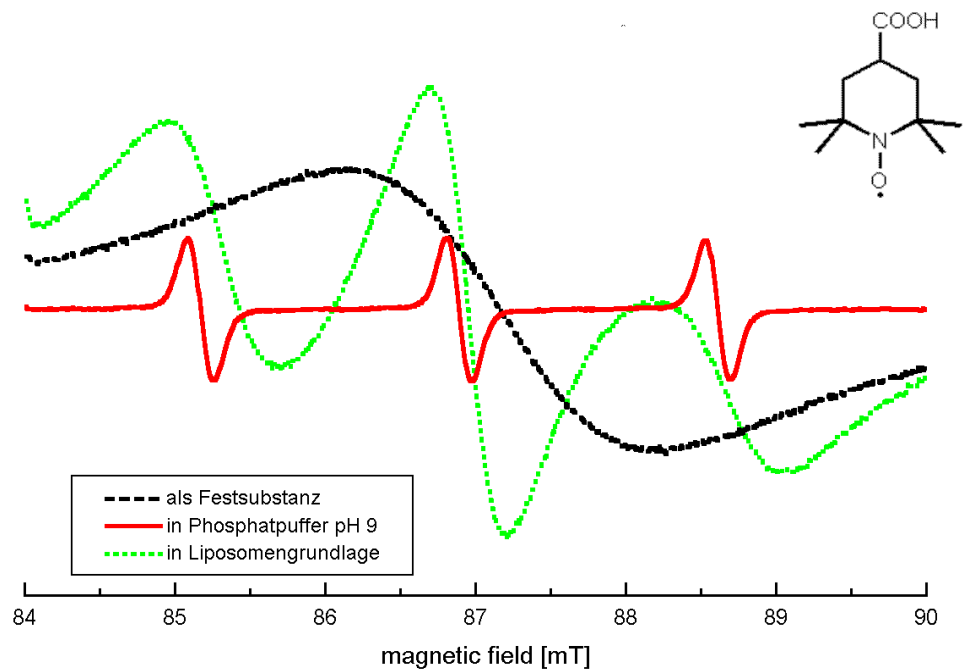


Abbildung 107: 2,3 GHz S-Band-ESR-Spektren der Spinsonde **6**, gemessen als Festsubstanz, sowie gelöst ($20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) in wässriger Pufferlösung und in der Liposomengrundlage.

8.2.2 Meßanordnung

Die folgenden in Abbildung 108 und 109 dargestellten Probenanordnungen zur Arbeit mit isolierten Hautproben wurden für die durchgeführten Untersuchungen konzipiert, realisiert und erstmals eingesetzt:

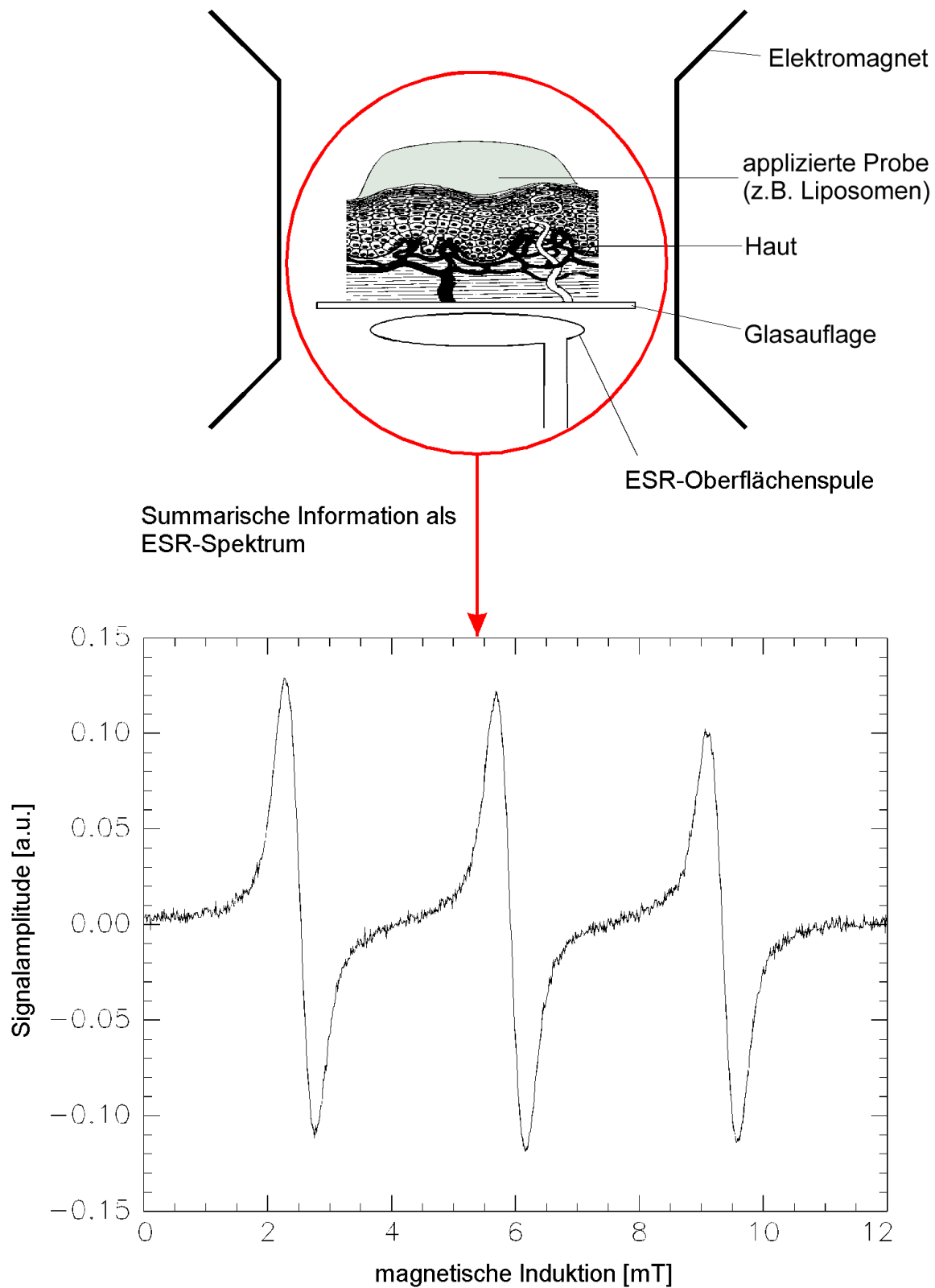


Abbildung 108: Probenanordnung zur nichtinvasiven Untersuchung von exzidierten Hautstücken mit Hilfe von Oberflächenspule und 2,3 GHz S-Band-ESR-Spektroskopie.

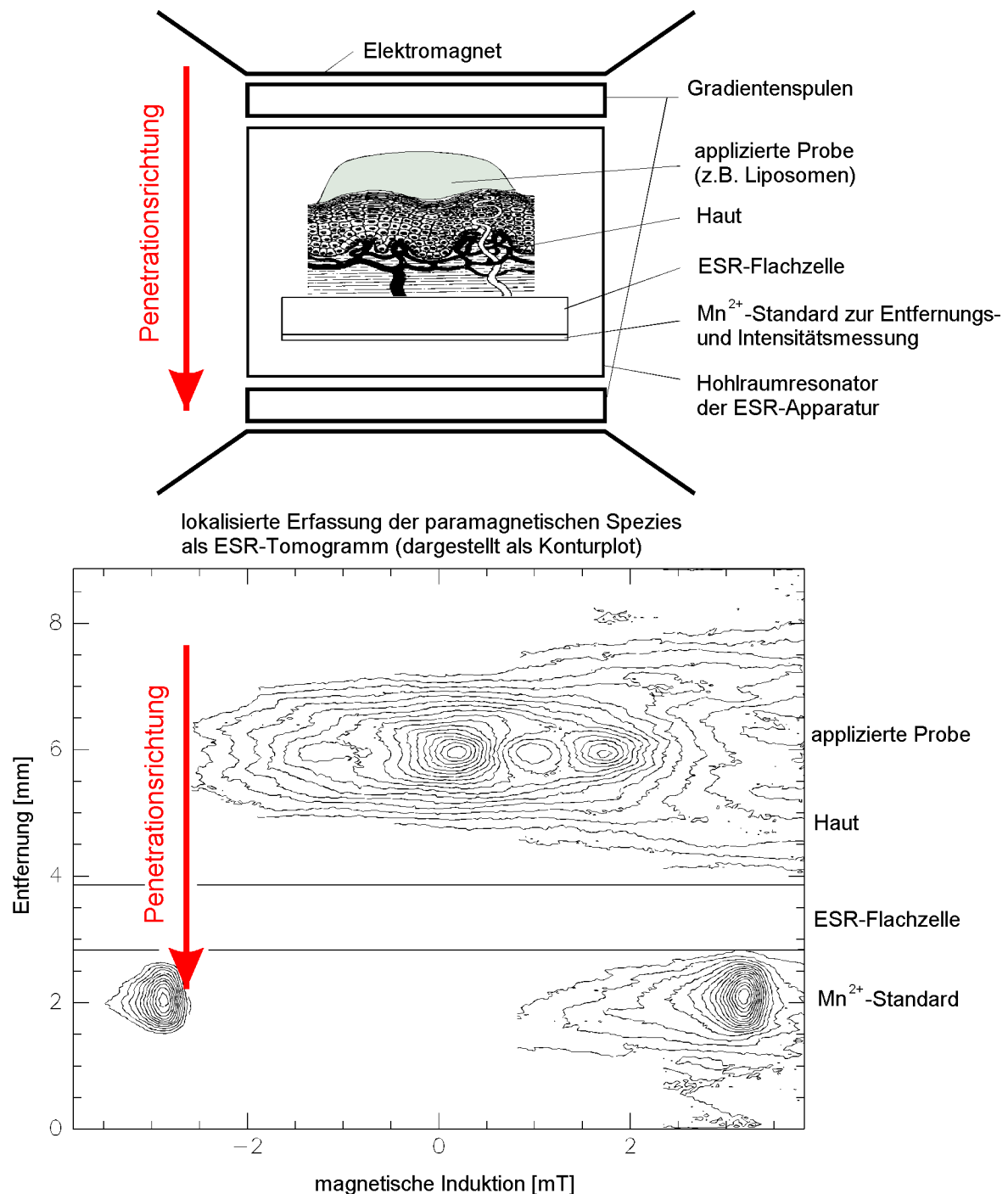


Abbildung 109: Probenanordnung zur nichtinvasiven und orts aufgelösten Untersuchung von exzidierten Hautstücken mittels der 9 GHz X-Band-ESR-Tomographie und moduliertem Feldgradienten.

8.2.3 Integrität von Modell-PC-Liposomen in isolierter Mäusehaut

Hierzu wurde das Verhalten von Phosphatidylcholin-Liposomen mit 500 - 800 nm Durchmesser, welche Nitroxid **6** als geladene und hydrophile Spinsonde ($P_{\text{Heptan/Puffer}} = 0,04$; pH 7,4) in Pufferlösung enthielten, auf isolierter Haut von Nacktmäusen untersucht. Die ESR-Spektren, die Reduktionskinetik der Spinsonden und die Penetrationsgeschwindigkeit wurden erfaßt, ausgewertet und mit den Ergebnissen nach Applikation von Pufferlösungen sowie Phosphatidylcholin-Puffer-Mischungen verglichen. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der spektroskopischen- (Abbildung 110) und tomographischen ESR- (Abbildung 111 und 112) Untersuchungen.

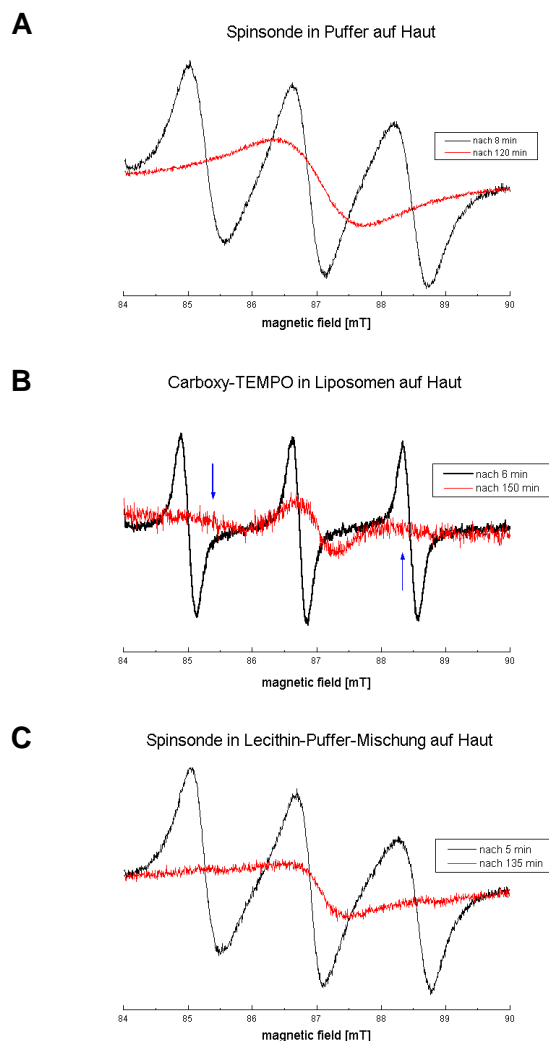


Abbildung 110: S-Band-ESR-Spekteren von Spinsonde **6** gelöst in Phosphatpuffer pH 9 (A), in Liposomen (B) und in Lecithin-Puffer-Mischung (C) (ohne Liposomenpräparation) nach Applikation auf isolierter Mäusehaut.

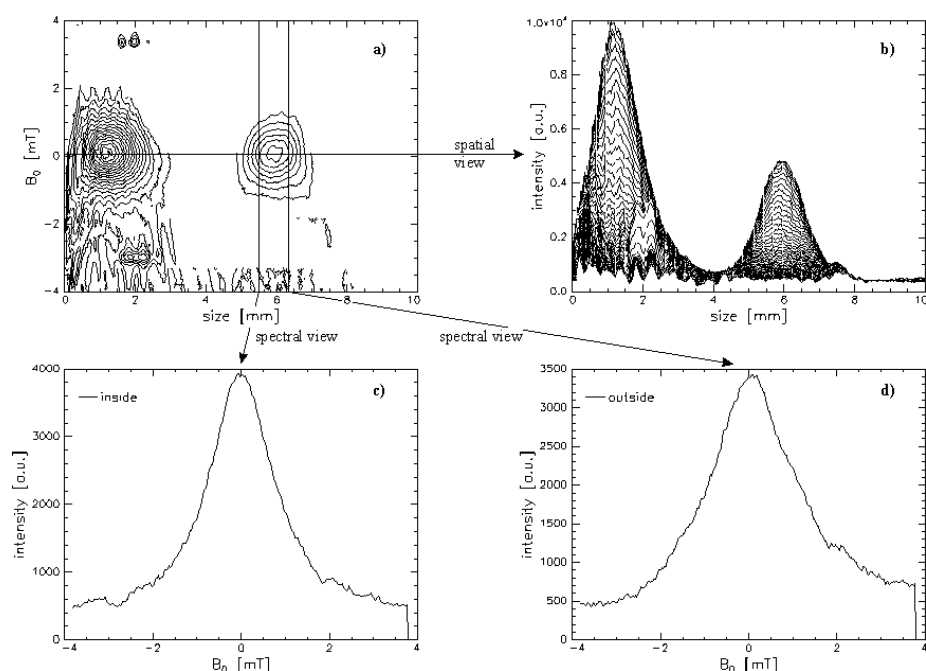


Abbildung 111: Spinsonde **6** in Pufferlösung (pH 9) 105 min nach Applikation auf Mäusehaut. a.) Konturplot mit Mn^{2+} -Standard; b.) räumliche Ansicht mit Mn^{2+} -Standard; c.) integriertes Spektrum lokalisiert innerhalb der Haut; d.) integriertes Spektrum lokalisiert oberhalb der äußersten Hautschicht (an der Hautoberfläche).

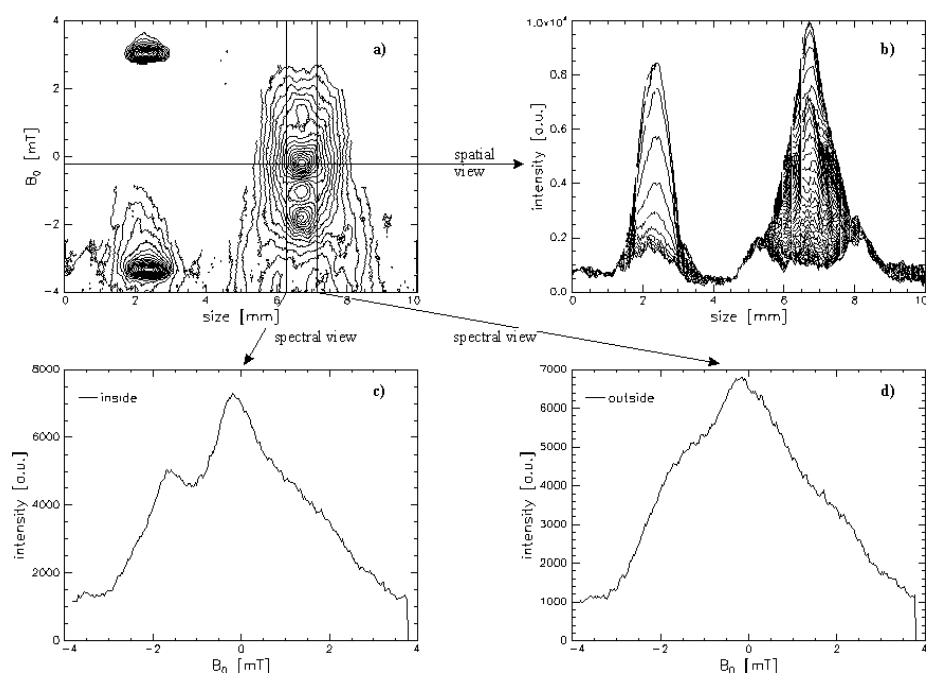


Abbildung 112: PC-Liposomen mit Spinsonde **6** in Pufferlösung (pH 9) 120 min nach Applikation auf Mäusehaut. a.) Konturplot mit Mn^{2+} -Standard; b.) räumliche Ansicht mit Mn^{2+} -Standard; c.) integriertes Spektrum lokalisiert innerhalb der Haut; d.) integriertes Spektrum lokalisiert oberhalb der äußersten Hautschicht (an der Hautoberfläche).

Mit Hilfe der X-Band-ESR-Tomographie konnten die ESR-Signale der Spinsonde **6** (Carboxy-TEMPO) nach Auftragen auf Mäusehaut in Penetrationsrichtung orts aufgelöst werden. Durch Vergleich mit einem ortsfesten paramagnetischen Standard (Mn^{2+}) konnten die Penetrationsstrecken als Differenzwerte der beiden ESR-Signale (Sonde und Standard) direkt erfaßt werden. In Abbildung 113 sind die Ergebnisse der Messung der Penetrationsstrecke graphisch dargestellt.

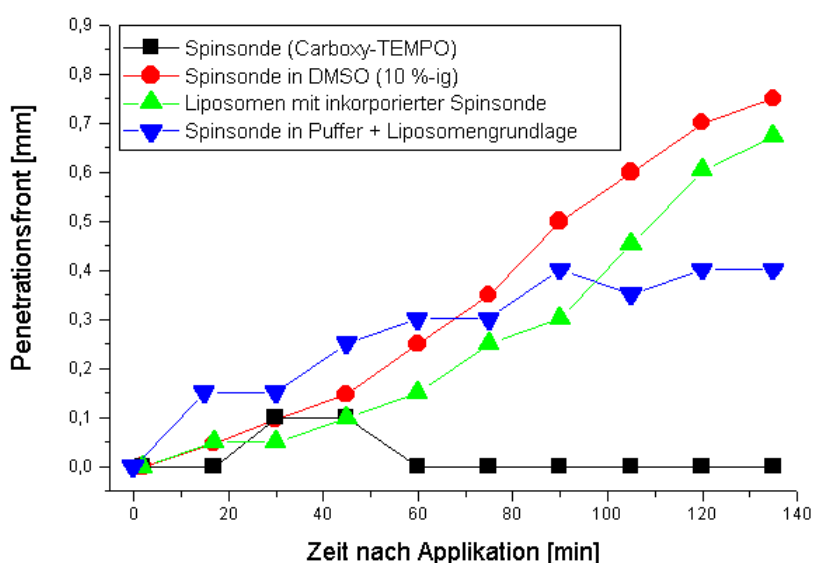


Abbildung 113: Penetration der Spinsonde **6** (Carboxy-TEMPO $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ in Pufferlösung pH 9, in Pufferlösung pH 9 mit 10% DMSO, inkorporiert in PC-Liposomen und in Puffer-Lipid-Mischung) aufgetragen auf isolierte Haut von Nacktmäusen.

Als Ergebnis dieser Arbeiten kann festgestellt werden, daß die S-Band-ESR-Spektroskopie eine kontinuierliche Erfassung der Signalgestalt und -intensität von Spinsonden erlaubt, die mit dem entsprechenden Arzneiträger, d.h. mit den Liposomen in bzw. durch die Haut penetrieren bzw. permeieren. Darüber hinaus liefert die Methode Informationen zur Mobilität der verwendeten Spinsonde und ermöglicht Aussagen zur lokalen Umgebung der Spinsonde. Anhand der ESR-Spektren kann man erkennen, ob die eingesetzte Spinsonde noch in der Liposomenmatrix, in der Lipidgrundlage oder in Hautbestandteilen lokalisiert ist. Die durchgeführten ESR-tomographischen Arbeiten gestatteten es, zusätzlich sowohl nichtinvasive Messungen der Penetrationsgeschwindigkeit von Spinsonden, als auch deren räumliche Verteilung in biologischen Proben zu erfassen. Die mittels Nitroxid **6** spinmarkierten Liposomen zeigen eine deutlich erhöhte In-vitro-Penetrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur reinen Spinsonde in Pufferlösung. Der Effekt ist mit der Enhancerwirkung

von DMSO in der Haut in quantitativer Hinsicht vergleichbar. Mischungen aus Spinsonde, Puffer und Liposomengrundlage zeigen ebenfalls eine erhöhte dermale Penetration. Die liposomal inkorporierte Sonde ist in ca. 100 µm Hauttiefe noch partiell mobil. Untersuchungen zur Reduktionskinetik der Spinsonde in der Haut deuten auf eine verzögerte Reduktion nach Applikation von Liposomen mit eingeschlossener Spinsonde hin.

8.3 Diskussion

Die untersuchten Liposomen beschleunigen die In-vitro-Penetration der polaren Spinsonde **6** in isolierter Mäusehaut. Der Enhancereffekt der Phosphatidylcholingrundlage ist quantitativ mit dem von DMSO trotz eines anderen Mechanismus [244] vergleichbar. Insofern ist der Einsatz von Phosphatidylcholinliposomen zur Penetrationsverbesserung sinnvoll, obwohl fraglich bleibt, inwieweit die Formulierung einen signifikanten Einfluß auf Ausmaß und Geschwindigkeit der Spinsondenpenetration besitzt.

Vergleichsmessungen mit Mischungen von Liposomengrundlage und wäßriger Pufferlösung (ohne Liposomenpräparation) zeigten Unterschiede in der Reduktionskinetik der Spinsonde. Trotz vergleichbarer Enhancerwirkung der Liposomen wird die Reduktion der Sonde in der Liposomenpräparation verzögert. Somit liegt die Vermutung nahe, daß die auf die Hautoberfläche applizierten Liposomen das Stratum corneum durchdrungen haben und möglicherweise in geringen Umfang in intakter Form in den tieferen Bereichen der exzidierten Mäusehaut vorliegen. Allerdings sind diese ersten Ergebnisse nicht direkt auf humane Haut übertragbar, da es gravierende Unterschiede im anatomischen Aufbau (Dicke des Stratum corneum, Anzahl der Haarfollikel) und in der biochemischen Zusammensetzung (Ceramidgehalt des Stratum corneum) zwischen humaner und tierischer Haut gibt. Aus diesem Grund werden inzwischen von den Behörden verschiedener Staaten (z.B. USA und Kanada) Penetrationsstudien mit tierischer Haut [245] bei verschiedenen pharmazeutischen und toxikologischen Fragestellungen nicht mehr akzeptiert.

Zur Fortführung der vorliegenden Arbeit sind im Rahmen des genehmigten DFG-Projektes (Bo 1350/2-1) weitere Untersuchungen auch unter Berücksichtigung von Ceramiden als Vesikelbildner vorgesehen. Es ist geplant:

- (i) die weitgehende Verwendung von exzidiierter Humanhaut und Hautmodellen auf Basis humaner Keratinozyten
- (ii) die Herstellung und Anwendung von kleineren Liposomen mit definierter Größe (50 - 400 nm) und möglichst enger Größenverteilung

- (iii) die Verwendung von verschiedenen aufgereinigten Liposomengrundlagen sowie die Variation von Rigidität und Größe der anzuwendenden Liposomen
- (iv) die Synthese geeigneter ESR-Spinsonden

Weiterhin ist im Rahmen der dafür erforderlichen gerätetechnischen Entwicklung der Bau und die Optimierung einer Zusatzeinrichtung zur X-Band-Tomographie vorgesehen, die die ESR-Messungen bei definierten Temperaturen und Luftfeuchten gestatten. Darüber hinaus ist in Zusammenarbeit mit der Firma Magnettech GmbH die Entwicklung eines S-Band-ESR-Tomographiegerätes zur nichtinvasiven und orts aufgelösten Messung am Versuchstier und am Menschen geplant.

9 Zusammenfassende Diskussion und Schlußfolgerungen

Im Hinblick auf die Anwendung von Nitroxiden als Spinsonden im Rahmen der In-vitro- und In-vivo-ESR-Spektroskopie sowie auf deren Verwendung als potentielle Arzneistoffe bestand erheblicher Informationsbedarf zur Analytik, Stabilität und Biotransformation dieser Verbindungen.

Zunächst wurden durch die Anwendung und Anpassung verschiedener chromatographischer und spektroskopischer Methoden wesentliche Voraussetzungen für die Untersuchungen zur Stabilität, Reaktivität und Biotransformation geschaffen. Besonders mittels Einsatz und Optimierung neuer Methoden der Probenvorbereitung, wie der **Festphasenmikroextraktion (SPME)**, konnten Zersetzungsprodukte und Metaboliten direkt und unter Vermeidung von Artefakten detektiert, strukturaufgeklärt und quantifiziert werden. Mit der Entwicklung einer **neuartigen On-line HPLC-(cw)-ESR-Kopplung** wurde eine weitere Grundlage für Untersuchungen zur Stabilität, Reaktivität und Biotransformation von Nitroxylradikalen geschaffen. Dazu wurde das verwendete ESR-Spektrometer direkt über ein eigens entwickeltes 3-Wege-Ventil an den DAD-Ausgang eines HPLC-Gerätes angeschlossen. Damit läßt sich jedes gemessene ESR-Signal eindeutig einem bestimmten separierten HPLC-Peak zuordnen. Bei ausreichender chromatographischer Auftrennung wird mittels der bisher entwickelten On-line HPLC-ESR(cw)-Kopplung eine mit der cw-ESR vergleichbare Nachweisgrenze von organischen Radikalen von $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht. Mit dieser neuen Kombinationsmethode lassen sich nun Fragestellungen untersuchen, die der klassischen ESR-Spektroskopie bisher nicht zugänglich sind. Damit ist das Potential dieser Kopplung aber sicher noch nicht ausgeschöpft.

Die untersuchten Nitroxide mit Piperidin-, Imidazolin-, Imidazolidin- und Pyrrolidinstruktur zeigen über einen Zeitraum von 10 Wochen keinerlei Zersetzung in neutraler Pufferlösung bei 25°C und 37°C. Sie sind ebenfalls unter den Bedingungen der Probenvorbereitung, gegenüber laborüblicher Ultraschallbehandlung zwecks Löslichkeitsverbesserung sowie unter den Bedingungen der Sterilisation mit Hilfe von γ -Strahlen stabil. Dabei traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Nitroxiden auf. In stark sauren Medien, wie z.B. im künstlichen Magensaft, erfolgt eine Disproportionierung, die aber nicht vollständig reversibel ist. Eine fast vollständige Zerstörung der Nitroxide konnte erst unter Extrembedingungen, wie z.B. einstündiges Erhitzen bei 80- 90°C in 1 M Salzsäure, nachgewiesen werden. Die durch reduktive Biotransformation gebildeten sekundären Amine

sind ebenfalls stabile Verbindungen, während die korrespondierenden Hydroxylamine ausgesprochen instabil bzw. reaktionsfreudig sind und eine ausgeprägte Reoxidation zu den paramagnetischen Nitroxiden zeigen. Das Ausmaß der Reoxidation korreliert mit der Sauerstoffkonzentration der umgebenden Atmosphäre ($0,24 \leq v \leq 0,44 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bei 100% Sauerstoffatmosphäre).

Der Einfluß der Ringstruktur sowie der Effekt von Substituenten auf die Reaktivität der Nitroxylverbindung wurde mittels elektrochemischer und chemischer Methoden untersucht. Dabei wurde insbesondere der Einfluß des pH-Wertes auf die Bildung der korrespondierenden Hydroxylamine überprüft. So wird mit abnehmenden pH-Wert die Reduktion der Verbindungen erleichtert. Während das unsubstituierte Nitroxid **1** das positivste elektrochemische Peakpotential aufwies, verschoben alle untersuchten paraständigen Substituenten dieses zu negativeren Werten und erleichterten somit die **Reduktion**. Dies läßt sich auf die elektronenziehenden Effekte dieser Substituenten zurückführen. Beim Benzoessäureester **5** ist der elektronenziehende Effekt so stark, daß der Einfluß des pH-Wertes auf das Peakpotential im neutralen und sauren pH-Bereich vollständig nivelliert wird. Die Imidazolin-, Imidazolidin- und Pyrrolidinnitroxide besitzen allgemein wesentlich positivere Peakpotentiale und sind somit elektrochemisch wesentlich leichter reduzierbar. Der Einfluß von elektronenziehenden bzw. -schiebenden Substituenten ist bei Imidazolnitroxiden besonders stark ausgeprägt, da hier die Wechselwirkung zwischen Substituent und Radikalfunktion durch die Doppelbindung im Ringsystem erleichtert ist. Bei der Variation des pH-Wertes konnte eine deutliche Veränderung des Reduktionsverhaltens festgestellt werden. Mit zunehmender Protonenkonzentration wird die Bildung des korrespondierenden Hydroxylamins erleichtert, und das Peakpotential verschiebt sich zu positiveren Werten. Die pH-sensitiven Imidazolin- und Imidazolidinnitroxide zeigen in Abhängigkeit vom pK_a -Wertes des Stickstoffs in 3-Position zusätzlich einen **charakteristischen Anstieg** im Peakpotential. Diese Werte stehen in sehr guter Übereinstimmung mit der pH-abhängigen Änderung der Hyperfeinkopplungskonstante a_N im ESR-Spektrum. Untersuchungen unter Verwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel bestätigten diese Befunde für die neutralen Nitroxide. Da die eigentliche Reaktion mit dem Ascorbinsäureanion erfolgt, nimmt die Geschwindigkeit bei $\text{pH} < \text{pK}_a \text{ Asc.}$ wieder ab, erst entsprechend korrigierte Werte zeigen einen mit der elektrochemischen Reduktion vergleichbaren Geschwindigkeitsanstieg. Für Verbindungen mit protonierbaren Gruppen, wie z.B. Nitroxid **4** und **6**, weichen die Befunde mittels Ascorbinsäure von den elektrochemischen Ergebnissen ab. Dies könnte auf spezifische Wechselwirkungen zwischen dem

234

Ascorbinsäureanion, und den bei diesen pH-Werten protonierten und damit geladenen Verbindungen zurückzuführen sein.

Die In-vitro-Biotransformation von Nitroxiden und potentiellen Metaboliten wurde in verschiedenen mikrobiellen und subzellulären Modellsystemen untersucht. Hierbei konnten neben der bereits bekannten Bildung der Hydroxylamine auch die entsprechenden sekundären Amine als **neue, bisher nicht beschriebene Metabolite identifiziert** werden. Diese Reaktion trat nur in isolierten Mikrosomen auf, so daß eine Beteiligung von Cytochrom P-450 unter reduktiven Bedingungen anzunehmen ist. Dieser Biotransformationsschritt trat ausschließlich bei Nitroxiden mit Piperidinstruktur auf und machte quantitativ nur wenige Prozent bezogen auf den Gesamtumsatz des Nitroxylradikals aus, wobei als dominierendes Reaktionsprodukt das diamagnetische Hydroxylamin gebildet wurde. Die Abwesenheit dieser Reaktion bei Imidazolin-, Imidazolidin- und Pyrrolidinnitroxiden könnte durch deren positivere Peakpotentiale und die damit erleichterte Reduktion zu Hydroxylaminen erklärt werden. Möglicherweise ist damit die Bildung von Hydroxylaminen bevorzugt und die anschließende Reduktion zum sekundären Amin erfolgt nicht mehr. Weiterhin konnte durch eigene Untersuchungen gezeigt werden, daß zusätzlich eine **Oxidation der sekundären Aminogruppe** bei 4-substituierten 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinen durch mikrosomale Enzyme erfolgt. Versuche zur Biotransformation von Nitroxiden und sekundären Aminen mit der isoliert perfundierten Rattenleber als komplexeres Untersuchungssystem bestätigten, die mit subzellulären Fraktionen erhaltenen Ergebnisse. Somit wird die Metabolisierung der Nitroxylradikale in der Leber über einen **komplexen Redoxzyklus** gesteuert, in dem verschiedene Enzymsysteme involviert sind. Die Lage des Redoxgleichgewichtes wird dabei durch vorhandene Substrate, durch die aktuelle Sauerstoffkonzentration und durch den Redoxzustand des biologischen Systems bestimmt.

Neben Reduktionsreaktionen der paramagnetischen Nitroxylfunktion wurden auch Veränderungen an anderen Positionen der chemischen Ringstruktur festgestellt. So wurde bei der Biotransformation des 4-Oxo-Derivates **3** neben weiteren Produkten auch die 4-Hydroxy-Verbindung **2** detektiert. Damit konnte erstmals die Bildung einer Spinsonde aus einer anderen während der Metabolisierung nachgewiesen werden. Diese **Ketoreduktion** erfolgt ausschließlich im Zytosol und wird somit nicht über das membranständige Cytochrom P-450 katalysiert. Verantwortlich ist hierfür ein Enzym aus der Gruppe der Ketoreduktasen, das durch den Ketoreduktaseinhibitor Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid, ein Flavonoid vom Flavonoltyp) nicht signifikant gehemmt wird. Die Reaktion scheint unter diesen Bedingungen

irreversibel zu sein, da bei Verwendung von **2** als Substrat eine Oxidation der Hydroxylfunktion nicht festgestellt wurde. Bei der Untersuchung von Derivat **5** konnte die enzymatische Esterspaltung zu **2** und Benzoesäure in der zytosolischen Zellfraktion nachgewiesen werden. Die verwendeten Imidazolin-, Imidazolidin- und Pyrrolidinnitroxide wurden dabei in allen Untersuchungen ausschließlich zu den korrespondierenden Hydroxylaminen metabolisiert.

Obwohl in der Literatur mehrfach diskutiert, konnte in den durchgeführten Untersuchungen, mit Ausnahme eines Konjugates, bisher kein eindeutiger Beweis für die Bildung von Phase-II-Metaboliten während der Biotransformation von Nitroxylradikalen mit Piperidingrundkörper sowie Imidazol-, Imidazolidin- und Pyrrolidinstruktur erbracht werden. Nur bei der Biotransformation von Piperidinnitroxiden, wie z.B. von Verbindung **1**, wurde die **Acetylierung** des Stickstoffatoms in Position 1 festgestellt. Die Bildung dieser Verbindung ist jedoch vernachlässigbar gering, da sie in allen Fällen weniger als 1% der eingesetzten Nitroxidmenge beträgt. Die Abwesenheit von Glucuroniden und Sulfaten könnte auf die relative Größe der Glucuronsäure- bzw. Schwefelsäurereste zurückzuführen sein, da die NO-Gruppierung der Nitroxide durch die benachbarten Methylgruppen sterisch sehr gut abgeschirmt wird und somit nur wenig Raum für eine Bindung zur Verfügung steht.

Daß keine Konjugation in Parastellung der Piperidine bzw. in 3-Stellung der Pyrrolidine erfolgt, ist insofern erstaunlich, da einige Nitroxide schon über Säurefunktionen (z.B. **6** und **9**) bzw. über Hydroxylgruppen (z.B. **2**) verfügen und somit prinzipiell zur Bildung von C- bzw. O-Glucuroniden und Sulfaten befähigt sind, zumal dabei keine vorgeschaltete Phase-I-Reaktion erforderlich ist.

In **humanen Keratinozyten** werden Piperidinnitroxide neben den korrespondierenden Hydroxylaminen ebenfalls zu den sekundären Aminen reduziert. Da keine nachweisbare Reoxidation der diamagnetischen Produkte erfolgt, steigt die Konzentration der gebildeten Amine mit der Zeit kontinuierlich an. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Geschwindigkeit dieser Biotransformationsreaktion mit der Lipophilie der eingesetzten Verbindungen ansteigt und die Metabolisierung abhängig von verfügbaren freien Thiolgruppen ist. Die Beteiligung des **Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-Systems** an einer möglichen Reduktionsreaktion und eine gleichzeitige Bildung von sekundären Aminen ist bisher in der Literatur kontrovers diskutiert worden. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse belegen erstmals diesen enzymatisch katalysierten Reduktionsschritt bei Nitroxiden. Das fremdstoffmetabolisierende Cytochrom P-450 ist

nachweisbar nicht an der Entstehung der sekundären Amine in Keratinozyten beteiligt. Ebenfalls konnte durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse die Bildung von weiteren diamagnetischen Biotransformationsprodukten durch hydrolytische Reaktionen und Ketoreduktion bestätigt werden. Das Auftreten von Konjugaten als Phase-II-Metabolite konnte dagegen nicht nachgewiesen werden, obwohl diese Keratinocyten über die entsprechenden Enzymsysteme verfügen.

Bei Untersuchungen zur Cytotoxizität der verwendeten Nitroxide und Vergleichssubstanzen mittels Amidoschwarz- und Neutralrot-Assay konnte festgestellt werden, daß die Toxizität der untersuchten Nitroxide weitgehend durch deren Lipophilie und Distributionsvermögen bestimmt wird. Bei den Piperidinnitroxiden korreliert die Cytotoxizität weitgehend mit der Lipophilie der Verbindungen (Korrelationskoeffizient $r = 0,96$), so daß hier der paraständige Substituent von besonderer Bedeutung für das Reaktionsverhalten ist. Die Radikalfunktion der Nitroxide besitzt dabei, bedingt durch die starke sterische Abschirmung der Methylgruppen, keinen nachweisbaren Einfluß auf die Cytotoxizität der Verbindungen (vgl. z.B. Nitroxid **2** und Amin **2C**). Als Ergebnis der Untersuchungen zur Cytotoxizität der Untersuchungssubstanzen kann festgestellt werden, daß die Verbindungen weniger bzw. vergleichbar cytotoxisch sind als die ausgewählten Modellarzneistoffe. Die IC_{50} -Werte der Cytotoxizität von Nitroxiden und sekundären Aminen sowie der untersuchten Modellarzneistoffe liegen trotz unterschiedlicher chemischer Struktur der Verbindungen in der gleichen Größenordnung.

Da nach Literaturhinweisen bestimmte Komponenten der mitochondrialen Atmungskette bei der Biotransformation von Nitroxiden von besonderer quantitativer Bedeutung sind, wurden Untersuchungen zu dieser Problematik an Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln durchgeführt. Hierbei konnte der bestimmende Einfluß des verfügbaren Sauerstoffs sowohl auf die Reaktionskinetik (bestimmt als V_{max} - und K_m -Werte) der Reduktion, als auch auf die Reoxidation der Hydroxylamine nachgewiesen werden. Durch Einsatz verschiedener selektiver Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette gelang es, das **Ubihydrochinon** als favourisierten Reaktionspartner der Nitroxide zu erkennen. Diese Erkenntnisse sind insofern neu, als daß die Beteiligung des Ubichinons zwar schon länger in der Diskussion ist, aber eine eindeutige Abschätzung der Wirkungen von Ubisemichinon, von Ubihydrochinon und weiteren Komponenten im Reaktionsgeschehen nicht möglich war.

Bei der Untersuchung der diamagnetischen Hydroxylamine konnte festgestellt werden, daß

eine **Reoxidation zum Nitroxylradikal durch generiertes Superoxid** in submitochondrialen Partikeln erfolgt. Das Ausmaß dieser Reoxidationsreaktion steht in guter Übereinstimmung mit der Verfügbarkeit von Sauerstoff und wird in submitochondrialen Partikeln durch die Entfernung der Mn-Superoxiddismutase während der Präparation weiter verstärkt. Eine Beteiligung der Cytochromoxidase, wie es in der Literatur bisher mehrfach diskutiert wurde, kann durch die positiven Effekte der verwendeten selektiven Inhibitoren weitgehend ausgeschlossen werden.

Die abschließend dargestellten **Anwendungsbeispiele** für die untersuchten stabilen Nitroxylradikale verdeutlichen deren Potential und Einsatzperspektiven im Rahmen biopharmazeutisch und pharmazeutisch-technologischer Fragestellungen. So konnten z.B. bei Modelluntersuchungen zur Stabilität von hydrolyseempfindlichen Lokalanästhetika in wäßriger Wollwachsalkoholsalbe gezeigt werden, daß die mit Hilfe pH-sensitiver Spinsonden und der ESR-Spektroskopie eine kontinuierliche Erfassung der pH-Wertänderungen in nichttransparenten W/O-Systemen möglich ist. Weiterhin sind diese pH-Wertmessungen auch für die Bearbeitung von Fragestellungen im Rahmen der pharmazeutischen Herstellung und Qualitätssicherung denkbar. Ein Beispiel ist der Einfluß verschiedener Glasqualitäten auf den pH-Wert in autoklavierten Ampullen. Die ESR-Spektroskopie gestattet aber auch die **nichtinvasive pH-Messung** in komplexen biologischen Systemen. Erste Arbeiten zu diesem Einsatzgebiet von Imidazolnitroxiden wurden in den letzten Jahren von Arbeitsgruppen in den USA [246] und Großbritannien [247] publiziert.

Mit Hilfe der S-Band-ESR-Spektroskopie und der X-Band-ESR-Tomographie konnte gezeigt werden, daß durch Einarbeitung geeigneter ESR-Spinsonden in Arzneiträgersysteme, interessante **biopharmazeutischen Fragestellungen**, wie z.B. die Problematik der Integrität von Liposomen und deren Penetration nach Applikation auf der Haut, direkt, nichtinvasiv und ortsaufgelöst bearbeitet werden können.

10 Gewonnene neue Erkenntnisse - Kurzzusammenfassung-

Analytik

Die neu entwickelte On-line HPLC-ESR-Kopplung sowie die optimierte SPME-GC sind sehr gut geeignet als analytische Methoden zur Erfassung von Nitroxiden und koexistierenden diamagnetischen Zersetzungs- und Biotransformationsprodukten.

Stabilität und Reaktivität

Nitroxide sind unter In-vitro-Bedingungen und während der Probenvorbereitung trotz ihres Radikalcharakters stabil, wohingegen paraständige Substituenten die Stabilität unter diesen Bedingungen nur in geringen Maße beeinflussen.

Die chemische und elektrochemische Reduktion der Nitroxide wird weitgehend durch die Substituenteneffekte, die Ringstruktur und durch die Verfügbarkeit von Protonen bestimmt.

Die korrespondierenden Hydroxylamine sind ausgesprochen instabile bzw. reaktive Verbindungen und zeigen eine ausgeprägte Oxidation unter Sauerstoffatmosphäre.

Metabolisierung und Toxizität

Die Reduktiongeschwindigkeit der Nitroxide in subzellulären Systemen sowie die Reduktion und Toxizität in Keratinozyten korreliert mit der Lipophilie (Verteilungskoeffizient P) der eingesetzten Verbindungen.

Der K_m -Wert der Reduktionsreaktion wird weitgehend durch den elektronenziehenden bzw. elektronenschiebenden Effekt der Substituenten bestimmt.

Neben den bekannten Hydroxylaminen entstehen weitere diamagnetische Biotransformationsprodukte, wobei sowohl die NO-Funktion, als auch die paraständigen Substituenten von der Metabolisierung betroffen sind.

Neue pharmazeutische Einsatzmöglichkeiten von Nitroxiden

Mittels Spinsonden und ESR-Spektroskopie ist die nichtinvasive Erfassung von pH-Wert, Polarität und Mikroviskosität in nichttransparenten, halbfesten oder festen pharmazeutischen Formulierungen möglich.

Durch nichtinvasive und orts aufgelöste Untersuchungen kann die Integrität und das Penetrationsverhalten von Liposomen in der Haut ermittelt werden.

11 Material und Methoden

11.1 Untersuchte Substanzen

Die Nitroxide **1** (TEMPO), **2** (TEMPOL), **3** (TEMPO), **4** (TEMPAMIN), **5** (TEMPOL-benzoat), **6** (Carboxy-TEMPO) und **9** (PCA) sowie die Referenzsubstanzen **1C** (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin), **1D** (2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidon•HCl) und **4C** (4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin) wurden von Sigma/ Deisenhofen bzw. Aldrich/ Deutschland bezogen. Verbindung **8** (CAT-1) stammt von Molecular Probes/ Oregon. Die Imidazolinderivate **11** (AT) und **12** (002A/92), das Imidazolidinderivat **13** (HM) sowie die Hydroxylamine **1B** (1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin) und **2B** (1,4-Dihydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin) wurden vom Institut für Organische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften, Novosibirsk, bezogen. Das Hydroxylamin **12B** (1-Hydroxy-2,2,4,5,5-pentamethyl-3-imidazolin) stammte von Janssen.

Verbindung **7** und **10** wurden nach folgender Vorschrift selbst synthetisiert.

Verbindung **7**: 5 g 4-Carboxy-4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin (von Aldrich) wurde in 100 ml H₂O₂ (5%ig) suspendiert, auf ca. 60 °C erwärmt und unter intensivem Rühren langsam mit FeCl₂-Lösung (100 mg) versetzt. Anschließend wurde 24 h bei ca. 60 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Ansäuern mittels Chloroform extrahiert und das gebildete Nitroxid mittels präparativer DC (rote Bande) isoliert.

Verbindung **10** wurde nach Vorschrift von *Gallez et al.* [39] mittels Dicyclocarbodiimid synthetisiert. Das gebildete Nitroxylradikal wurde mit Hilfe der präparativen Säulenchromatographie gewonnen.

11.2 Weitere Chemikalien

Sigma: Azelainsäure (Heptandicarbonsäure), Antimycin A, Rotenon , TTFA (4,4,4-Trifluoro-1-[2-thienyl]-1,3-butandion), Myxothiazol

Fluka: 4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin

Merck: Chloroform-d₁ (mind. 99,95% für die NMR), Deuteriumoxid (mind. 99,8% für die NMR), NEM (N-Ethylmaleinimid), Lösungsmittel (Methanol, Chloroform, Dichlormethan, Ethylacetat)

Wako (Japan): NADH(Nicotin-adenin-dinucleotid, red.), Deferoxamin - Desferal® (30-Amino-3,14,25-trihydroxy-3,9,14,20,25-pentaazatriacontan-2,10,13,21,24-pentaon), Triton X-100 (Polyoxyethylen(10)octylphenylether)

Serva: Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (aus Hefe, ~ 140 U/ mg), β-Glucuronidase/ Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (β-Glucuronidase E.C. 3.2.1.31 7,7 U/ ml, Arylsulfatase E.C. 3.1.6.1 14,1 U/ ml)

Boehringer Mannheim: β-D-Glucose-6-phosphat (Mononatriumsalz), NADP (Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat, Dinatriumsalz)

Ferrak: Wasserstoffperoxid

BDH Chemicals (UK): DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

VEB Berlin Chemie: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzen p.a.

VEB Impfstoffwerk Dessau: Human-Serumalbumin (lyophilisiert)

Laborchemie Apolda: Thymol, Thioharnstoff

Reachim USSR: DMSO (Dimethylsulfoxid)

Kommerzielle Puffersysteme:

PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer pH 7,4 (Sigma, Deisenhofen)

Isotonischer Phosphatpuffer zur Zellzucht (Staatl. Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin)

pH-Pufferlösungen für Kalibrierzwecke (Ingold Meßtechnik, Steinbach)

11.3 Analytische Methoden

Der Aufbau, die Anwendung der vorliegenden Methoden sowie die statistische Auswertung basieren weitgehend auf den Vorschriften der ICH und der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, die chemischen Nomenklaturen entsprechen den Vorschriften der IUPAC und für die Bezeichnung von Gehalten wurden die rechtlich vorgeschriebenen Formelzeichen verwendet (DIN 1319 - Zusammensetzung von Mischphasen und DIN 32 631 - Gehaltsbereiche in der chemischen Analytik). Die Glaselektrode wurde mit Standardpuffern nach DIN 19266 kalibriert.

11.3.1 Spektroskopie

UV/VIS-Spektroskopie:

Shimadzu registrierendes UV/VIS-Spektrophotometer

IR- Spektroskopie:

FT-IR-Spektrometer FTS 135 C (Bio-Rad/ Digilab Analytical Instruments)

Elektronenspinresonanzspektroskopie:

S-Band-ESR-Spektrometer MT-1

X-Band-ESR-Spektrometer Miniscope MS 100 (Magnettech GmbH) mit Quarzflachzelle (Volumen 40 µl)

X-Band-ESR-Spektrometer ERS 300 (ZWG Adlershof) mit Quarzflachzellen verschiedener Volumina und Cr³⁺/ MgO-Standard

Kernresonanzspektroskopie :

¹H- und ¹³C-NMR am Institut für Chemie der HUB, Hierzu wurden jeweils 15- 25 mg Substanz eingesetzt und in Deuteriumoxid bzw. deuterierten Chloroform oder Methanol gelöst.

11.3.2 Chromatographische Verfahren

Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC):

Camag: Auftragegerät Linomat IV und Probenautomat III, Doppeltröglkammer und Horizontalkammer, Tauchkammer, TLC-Scanner II mit Auswertesoftware CATS, Merck HPLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ und C-18 modifizierte Kieselgelplatten 10cm•10cm und 10cm•20cm

Standardfließmittel - auf polaren Kieselgel Phasen - I (Toluen : Aceton : Methanol 7 : 2 : 1), II (Toluen : Aceton 9 : 1), III (Toluen : Aceton 8 : 2) und - auf RP-Phasen - IV (Methanol : Puffer pH 5), V (Methanol : Puffer pH 7), VI (Methanol : Puffer pH 9)

Gaschromatographie (GC):

Für die Arbeiten wurde ein Gas Chromatograph Hewlett Packard 5890 Series II mit einer HP-5 Kapillarsäule (Länge 30 m, Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 25 µm, Helium als Trägergas, Fluß 1 ml/ min) verwendet, der mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) sowie einem Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD) gekoppelt war. Die stationäre Phase der HP-5 Säule besteht aus Poly(5% diphenyl-95% dimethylsiloxan) und besitzt eine niedrige Polarität, zeigt gleichzeitig eine hohe thermische Stabilität (-60°C bis 320°C) und ermöglicht eine Elutionsreihenfolge der Verbindungen nach den Siedepunkten. Bei Splitverhältnissen von 1 : 8 bis 1 : 20 wurden jeweils 1 µl der Probenlösung injiziert bzw. bei der SPME die mit Polymer beschichtete Quarzfaser in den Desorptionsraum eingeführt. Dieser wurde mit einem Merlin Septum mit zweifacher Dichtung verschlossen, wodurch Systemlecks oder Septumbrüche weitgehend verhindert werden. Die Temperatur im Injektor wurde mit 250°C konstant gehalten. Durch den Ausschluß von Sauerstoff kann die Reoxidation der Hydroxylamine während des chromatographischen Prozesses minimiert werden. Eine vollständige Unterdrückung der Reoxidation war aber auch unter diesen völlig anaeroben Bedingungen nicht möglich. Da die untersuchten Carbonsäurederivate 6 und 9 keine

ausreichende Flüchtigkeit aufwies wurde eine Silylierung mit MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid; 100 µl Probe + 900 µl Silylierungsmittel, Reaktionszeit: 15 min bei 60 - 70°C) durchgeführt [248].

11.3.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektren der Verbindungen **7** und **8** wurden mit dem normalauflösendem Massenspektrometer Hewlett Packard 5995A mit Direkteinlaßsystem (Ionenquellentemperatur 140- 175°C; Elektronenenergie 70 eV) und im Fall aller anderen untersuchten Substanzen und Reaktionsprodukte unter Verwendung der GC-MS aufgenommen.

Für die GC-MS-Arbeiten wurde ein Gas Chromatograph Hewlett Packard 5890 Series II [HP-5 Kapillarsäule (Länge 30 m, Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 25 µm, Helium als Trägergas, Fluß 1 ml/ min)] verwendet, der Massenspektrometer Hewlett Packard 5989B (EI-Modus; Massenbereich 40-400; Ionenquellentemperatur 150- 160°C ; Elektronenenergie 70 eV) gekoppelt war.

11.3.4 On-line HPLC-ESR-Kopplung

HPLC: Merck-Hitachi L-6200A Intelligent Pump, D-6000 Interface, L-4500 Diode Array Detector, Chromatography Data Station Software; Säule LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm); Injektionsvolumen 20 µl; DAD-Detektor 200-400 nm (Festwellenlänge 254 nm); mobile Phase: A (für **10**): Gradient - MeOH:H₂O 52:48 (0 min)-> MeOH: H₂O 88:12 (5 min), dann isokratisch (5-15 min), Fluß 1 ml/min

ESR: X-Band-ESR-ESR-Spektrometer MS 100 mit Quarz-Durchfluß-Flachzelle (40 µl Probeninhalt); Probenfüllung vom unterem Ende der Flachzelle; Spektrenparameter: Modulationsfrequenz 100 kHz, Mikrowellenleistung 10 mW, Verstärkung 100, Modulationsamplitude 0,1 mT, Bo-Feld 337,5 mT, Scanbereich 10 mT, Scanzeit variabel

Kopplung - Das MS 100 wurde mit Hilfe einer PEEK-Kapillare an den Ausgang des L-4500 Diode Array Detektors angekoppelt. In diese Verbindung wurde ein PEEK-T-Stück eingebaut sowie ein elektronisch angesteuertes 3-Wege-Ventil nachgeschaltet. Der Ausgang der Flachzelle im MS 100 ist ebenfalls mit dem Ventil über PEEK-Kapillaren verbunden. Von dort gelangt die Probe respektive das Laufmittel in den Abfall. Sowohl die einzelnen Verbindungsstücke, als auch das konstruierte Ventil wurden auf möglichst kleine Totvolumina optimiert.

11.3.5 Weitere Analysenmethoden

Differentielle Puls Polarographie (DPP):

Polarograph POL 150 mit MDE 150 (Radiometer Copenhagen); Software Tracemaster 5 (Version 2.02;2.03); Arbeitselektrode: DME; Referenzelektrode: Ag/ AgCl/3 N KCL; Hilfselektrode: Pt-Draht.

Die Britton-Robinson-Puffer wurden nach tabellierten Werten [249] hergestellt und mit Natronlauge eingestellt. Der pH-Wert wurde mittels Wasserstoffelektrode (des Kurt-Schwabe-Instituts für Meß- und Sensortechnik e.V. Meinsberg sowie MV 870 Digital-pH-Meßgerät der Fa. VEB Präcitronic Dresden) überprüft. Das Digital-pH-Meßgerät wurde unter Verwendung eines Normalelementthermostats Typ 0129 der Fa. RFT Gerätewerk Chemnitz kalibriert. Für die DPP-Messung wurden 95 ml der Pufferlösung mit 5 ml Nitroxidlösung (1 mmol·l⁻¹ in Aqua bidest.) gemischt und direkt verwendet.

Sauerstoffmessungen:

MultiLab P4 mit Sauerstoffsensor (Clark-Elektrode) TriOxmatic® 300 (WTW GmbH)

Meßbedingungen: 37°C; Magnetrührer mit 800 U/min; Probenvolumen 10 ml. Der

Sauerstoffverbrauch der Clark-Elektrode beträgt 0,009 mg/l pro h (bei 20°C) und kann für die durchgeführten Messungen vernachlässigt werden.

11.3.6 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten P

Der pH-Wert der wässrigen Phase (PBS-Puffer) wurde vor Versuchsbeginn auf 7,4 eingestellt und mittels Glaselektrode überprüft. Eine Überprüfung der zur Kalibrierung der Glaselektrode verwendeten Standardpuffer wurde mit der Wasserstoffelektrode durchgeführt. Die Ausgangskonzentration der untersuchten Verbindungen betrug $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vor Beginn der Messungen wurden organische und wässrige Phase gegeneinander gesättigt (> 2 h), um durch Mischungsvorgänge hervorgerufene Volumenänderungen auszuschließen. Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten erfolgte in gut verschlossenen 1,5 ml Eppendorfgefäßen (0,5 ml wässrige Phase + 0,5 ml organische Phase) im Thermomixer 5437 (Eppendorf) bei einer konstanten Temperatur von 37 °C über ein Zeitintervall von 2 h (1400 Schüttelbewegungen/ min). Vorversuche haben gezeigt, daß die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts nach 2 h abgeschlossen ist.

11.3.7 Extraktionsmethoden

Flüssig-Flüssig-Extraktion Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die Substanzen in Pufferlösungen gelöst (Endkonz. $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, isotonischer PBS-Puffer, pH = 9). Anschließend wurde die Lösung mit der dreifachen Menge Extraktionsmittel versetzt und 5 min im Scheidetrichter intensiv vermischt. Durch dreifache Extraktion der wässrigen Phase wurde der quantitative Übertritt der Verbindungen in die organische Phase überprüft. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum eingeeengt und in MeOH aufgenommen. Die Konzentration der Untersuchungssubstanzen wurde mittels HPTLC ermittelt.

Extrelut[®]1, 3 und 20-Säulen der Firma Merck wurden verwendet; der pH-Wert der Untersuchungslösung wurde eingestellt (pH 3, 7, 9) und 1, 3 bzw. 20 ml der Lösung auf die Säule gegeben, 15 equilibriert und mit Chloroform oder Ethylacetat als Elutionsmittel extrahiert; die gewonnenen Extrakte wurden in Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer (Rotavapor R 111 + Büchi 461 Wasserbad mit 40 °C) unter Vakuum eingeeengt.

Festphasenextraktion (SPE) Für die SPE wurden die in Kapitel 3.3.2 aufgeführten Extraktionskartuschen und die LiChrolut[®] Absaugeinheit der Firma Merck verwendet. Die Konditionierung des Trägermaterials erfolgte mittels Methanol. Für den anschließenden Reinigungsschritt kamen ausschließlich Pufferlösungen (Volumen 1 - 10 ml; maximaler Methanolanteil 10 %) zum Einsatz. Nach Trocknung erfolgte die Elution der aufgereinigten Analyten mittels kleiner Volumina eines geeigneten organischen Lösungsmittels (Methanol bzw. Chloroform).

Festphasenmikroextraktion (SPME) 7- μm -und 100- μm -PDMS (Polydimethylsiloxan)-Fasern mit Halterung von Supelco; Durchmischung und Temperierung mittels Wasserbad RCT basisc von IKA Labortechnik; Probenvorbereitung (Zellen und subzelluläre fraktionen wurden unter Eiskühlung mit Hilfe eines Ultraschallstabes - Sonoplus HD 70- 1•30 sec oder 3• 20 sec, 25 W - aufgeschlossen; bei direkter SPME anschließende Membranfiltration; 3,0 ml pro Probenvial und Zudosierung des internen Standards); optimierte Extraktionsparameter für **1** und **1C** (direkte SPME mittels 100 μm PDMS-Faser: Expositionszeit 5 min, Temperatur 25 °C, Rührgeschwindigkeit 400 U/ min, Desorptionstemperatur 250 °C, Desorptionszeit 1 min / Headspace SPME mittels 7 μm

PDMS-Faser: Expositionszeit 5 min, Temperatur 90 °C, Rührgeschwindigkeit 900 U/ min, Desorptionstemperatur 250 °C, Desorptionszeit 1 min).

11.4 Stabilitätsuntersuchungen

Stabilität in Lösung Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Nitroxide ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) in PBS-Puffer pH = 7,4 gelöst und 10 Wochen (verschlossene Gefäße, lichtgeschützt) bei einer mittleren Raumtemperatur von 25 °C sowie bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Die Probennahme erfolgte jeweils wöchentlich (Probenvolumen 3•3 ml für Extraktion; 1 ml für ESR-Untersuchungen). Die Aufarbeitung 3•3 ml Proben erfolgte durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Extrelut-Säulen (Extrelut[®]3-Säule; Konditionierung 15 min; Extraktionsmittel Chloroform) und Einengen der Extrakte im Vakuum bei Temperaturen von max. 40 °C. Die Quantifizierung wurde mittels HPTLC auf Kieselgelplatten Merck[®] 10•10 ohne Fluoreszenzindikator, 3•3 Standardauftragungen, Doppelauftragung jeder Analyse; Plattenentwicklung in Camag-Horizontalkammern) und densitometrischer Auswertung (Bestimmung der Absorptionsmaxima, Kurvenanpassung mittels Polynomregression) durchgeführt.

Stabilität im künstlichem Magen- und Darmsaft Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Nitroxide jeweils zu $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sowohl in künstlichen Magensaft (Pepsin-Salzsäure-Lösung 0,10 g Pepsin in 99,4 ml Wasser + 0,60 ml Salzsäure $6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH = 1,4), als auch in künstlichem Darmsaft (Pankreatin-NaHCO₃-Lösung 0,280 g Pankreatin+ 1,50 g NaHCO₃ in 100 ml Wasser gelöst; pH = 7,4) gelöst. Anschließend wurden die Lösungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad über einen Versuchszeitraum von einer Woche inkubiert. Die Probennahme erfolgte anfangs im Minutenabstand, später im Stunden- und Tagesabstand. Die gezogen Proben wurden unverzüglich bei - 80°C eingefroren, zwischengelagert und danach unmittelbar nach dem Auftauen mittels S-Band-ESR-Messung vermessen. Die Proben im künstlichen Magensaft wurden sowohl direkt, als auch nach Einstellen mit 1N Natronlauge auf pH 10 (nach 60 min) untersucht.

Stabilität unter Streßbedingungen Zur Untersuchung der Stabilität unter Streßbedingungen wurden die Nitroxide ($100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Wasser (mit NaOH eingestellt auf pH = 7), in HCl ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) sowie in NaOH ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) jeweils 1 h unter Rückfluß erhitzt (80°C). Die Aufarbeitung der Proben erfolgte ebenfalls mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (Extrelut[®]1, 3 und 20-Säulen).

11.5 Pilz- und Zellkultur sowie Organperfusion

11.5.1 Cunninghamella elegans ATCC 9245 und echinulata ATCC 9244

Cunninghamella elegans und C. echinulata wurden auf Sabouraud-Dextrosemedium (pH 5,7) als Submerskultur kultiviert. Die Oberflächenkultur in Schrägagarröhrchen wurde mit 5 ml sterilen Medium abgespült und die Suspension diente als Inoculum für 25 ml Medium in 125-ml Erlenmeyerkolben (Phase I). Die Phase-I-Kulturflaschen wurden 48-72 h in einem Inkubationsschüttler (250 rpm und 27 °C) inkubiert. 3 ml der aktiven Kultur I wurden entnommen und mit 25 ml Kulturmedium versetzt und inkubiert (Phase II). Nach 48 oder 72 h wurden Teile der Pilzkultur für ESR-Messungen entnommen oder entsprechende Substrate zugesetzt (Substrate wurden in 1ml Kulturmedium gelöst und sterilfiltriert, bzw. alternativ in DMSO gelöst; Endkonzentration an DMSO max. 0,5 %) und mit der Pilzkultur definierte Zeiten bei 27 °C inkubiert. Für die anschließenden Untersuchungen zum Metabolitenmuster

wurden die Pilzzellen aufgeschlossen (mit flüssigem Stickstoff/ Seesand und Ultraschallstabes - Sonoplus HD 70 - 5 min, kontinuierlich, 25 W, Eiskühlung).

11.5.2 Isoliert perfundierte Rattenleber

Die Präparation der Rattenleber wurde in Anlehnung an [250] durchgeführt. Für die durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten verwendet. Nach Narkotisierung der Ratten mittels Hexobarbital (100 mg/kg, i.p.) wurde der Bauchraum geöffnet und eine Flexüle in die Pfortader eingeführt. Anschließend wurde die untere Hohlvene durchtrennt und die Leber in situ mit 50 ml isotonischen Phosphatpuffer (PBS) bis zur vollständigen Entfernung des Blutes perfundiert. Die Leber wurde vollständig herauspräpariert und in die Perfusionsapparatur überführt. In dieser erfolgte mit den im Perfusionsmedium (PBS-Puffer, pH = 7,4, 37°C, Carbogenspülung) gelösten Substraten ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) eine Perfusion mit 100 ml im geschlossenen Kreislauf über 2 h mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 15 ml/min. Die Möglichkeit des Auftretens von Luftbläschen wurde durch die Verwendung einer Blasenfalle ausgeschlossen. Die Probennahme erfolgte nach 0, 5, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min (jeweils 3,5 ml). Zusätzlich wurde eine Probe (180 min) mit Glucuronidase/Arylsulfatase versetzt und bei pH 4,6 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Probenvorbereitung von 3,0 ml (Extrelut®3-Säulen/ pH = 9/ Extraktionsmittel CHCl_3 ; anschließend einengen unter Vakuum bei 40°C und Aufnahme in 100 µl MeOH + interner Standard) erfolgte die Identifizierung der Metaboliten durch GC-Cochromatographie der gewonnenen Extrakte mit Referenzsubstanzen, der GC-MS sowie mit Hilfe der ESR nach vorheriger HPLC-Trennung.

11.5.3 Keratinozytenlinie HaCaT

Kultivierung Wurde von Prof. Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, bezogen. Die HaCaT-Zellen wurden in Dulbeccos Eagle Medium in Plastikpetrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm bei einer Inkubationstemperatur von 37°C mit spezieller Begasung (Carbogen: 95 % Sauerstoff/ 5 % Kohlendioxid) kultiviert. 3- 4 Tage nach der letzten Passage wurde das Medium erneuert und die Zellen mit dem frischen Medium solange weiterinkubiert, bis sie zu einem geschlossenen "Monolayer" ausgewachsen waren. Für Toxizitätsuntersuchungen wurden 96-Well-Platten verwendet.

Enzymaktivitäten DTNB-Assay: DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) wird zu gelb gefärbter 5'-Thionitrobenzoesäure ($\lambda_{\text{max}} = 412$; Extinktionskoeffizient $13600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) durch Thioredoxinreduktase/ NADPH reduziert (1 Unit gleich $1 \mu\text{mol}$ gebildete 5'-Thionitrobenzoesäure = ΔE_{412} pro min/ 27,2). Kurzbeschreibung des Reaktionsablaufs: 50 µl NADPH (40mg/ml Aquy dest.) + 0,5 ml 0,2 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA-Lösung + 1,0 ml Phosphatpuffer ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 7,0) + 0,8 ml DTBN (25 mg/ml in 99,5 % Ethanol) und 100 µl BSA (20 mg/ml) werden gemischt und mit Aqua dest. ad 10,0 ml aufgefüllt. 500 µl dieser Lösung werden mit 100 µl Probe gemischt und über 5 min bei 412 nm gegen den Kontrollwert (500 µl Lösung + 100 µl Puffer) vermessen.

Gelelektrophorese zur Nachweis von Thioredoxinreduktase in HaCaT-Zellen

Dazu wurden HaCaT-Zellen (6 Platten Ø 10 cm mit geschlossenen Zellmonolayer) durch einen Zellschaber abgelöst, die Proben in Pufferlösung ($50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5, $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA) gesammelt und mittels Ultraschallstab aufgeschlossen (15 min 50 W, Zykeln, Eiskühlung). Zellkerne und Bruchstücke wurden abzentrifugiert (10 min $1000 \cdot g$, 4°C) und Aminosäuren, Peptide und niedermolekulare Proreine durch Dialyse (24 h 60 ml gegen 1 l $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, Medienwechsel nach 2, 4 und 8 Stunden, Dialysemembran) abgetrennt. Das Dialysat wurde mit 1 M Essigsäure (Eiskühlung, Rühren)

auf pH 5,0 eingestellt und das Präzipitat abzentrifugiert (10 min 1000•g, 4°C) [251]. Der Überstand wurde mit 1 mol•l⁻¹ NH₄OH neutralisiert (pH 7,5), lyophilisiert (30 h, -40°C, 27 mbar) und mittels Gelelektrophorese untersucht. Es wurden verschiedene Tris-Glycin-Mischungen verwendet und jeweils entsprechende Proteinstandard mitgeführt.

Inkubation und Probenaufarbeitung zur In-vitro-Biotransformation

Der Zellkultur wurden anschließend definierte Mengen an Nitroxiden (100 µmol•l⁻¹ und 1 mmol•l⁻¹) zugesetzt. Nach den entsprechenden Umsetzungszeiten (6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h) wurden die Ansätze eingefroren bei -20 °C. Nach dem Auftauen wurden Kulturmedium und Monolayerzellen entfernt (unter Verwendung eines kommerziellen Schabers), die HaCaT-Zellen mechanisch aufgeschlossen (Bandelin Sonifier, 5 Zyklen a 20 sec., 25 W, Eiskühlung) und der pH-Wert durch Zusatz von Ammoniumhydroxid auf pH = 9 eingestellt. Für die Erfassung von gebildeten Metaboliten wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Verwendung von Extrelut®-Säulen eingesetzt. Für die gaschromatographische Quantifizierungen wurden 3,0 ml Probe entnommen, der interne Standard entsprechend zugesetzt und mittels SPME bzw. Headspace-SPME extrahiert.

Bestimmung der Cytotoxizität Für die Cytotoxizitätsuntersuchungen wurden die HaCaT-Zellen 6 h bzw. 24 h mit den Untersuchungssubstanzen in entsprechenden Konzentrationen inkubiert. Für alle Cytotoxizitätsuntersuchungen wurden ein Vergleich (Bahn 1 Zellen ohne Zusatz), zwei Kontrollen (Bahn 2 und 12 mit Lösungsmittel DMSO bzw. Aceton) und 9 Verdünnungen der Probe (verbleibende freie Bahnen) als Pipettierschema verwendet. Pro Bahn wurden alle 8 Vials beschickt (max. Kapazität einer 96-Well-Platte). Für die Cytotoxizitätsuntersuchungen wurden der Amidoschwarz-Assay und der Neutralrot Assay verwendet. Die Durchführung der Assays ist im folgendem kurz beschrieben:

Amidoschwarz Assay Der Amidoschwarz Assayt beruht auf der Anfärbung der nach Noxeneinwirkung noch angehefteten Zellen (Meßwellenlänge: 620 nm am SLT Mikrotiterplattenreader). Eine Differenzierung zwischen intakten und geschädigten (aber noch angehefteten) Zellen ist nicht möglich.

Notwendige Lösungen:

Formaldehydlösung (Lösung I) 10%ig

Amidoschwarzstammlösung (Lösung II) 0,1%ig in Wasser

Aqua bidest (angesäuert auf pH 3,0) (Lösung III)

0,05 N NaOH (Lösung IV)

Arbeitsschritte:

Inkubation der HaCaT-Zellen mit den Untersuchungssubstanzen (z.B. 24 h)

Fixieren (15 min) der Zellen mit Formaldehydlösung (Lösung I) 100 µl/ Well

Absaugen und Zugabe von Amidoschwarzstammlösung (Lösung II) 100 µl/ Well, 30 min inkubieren und absaugen

Waschen (2•) mit Aqua bidest. (Lösung III) 150 µl/ Well (den Überstand verwerfen)

Zugabe von NaOH (Lösung IV) 150 µl/ Well und 10 min schütteln (SLT Shaker) und bei λ = 620 nm vermessen.

Neutralrot-Assay Der Neutralrot-Assay beruht auf der Aufnahme und Speicherung von Neutralrot in den Lysosomen der intakten Zellen. Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran resultieren in einer verringerten Farbstoffretention während der Rücklösung (Meßwellenlänge: λ = 550 nm am SLT Mikrotiterplattenreader).

Notwendige Lösungen:

Neutralrotstammlösung (Lösung I) 0,4%ig in Aqua bidest.

Formaldehydlösung (Lösung II) 1%ig (mit 1% CaCl₂)

Essigsäure (Lösung III) 1%ig in 50% Ethanol

Arbeitsschritte:

Inkubation der HaCaT-Zellen mit den Untersuchungssubstanzen (z.B. 24 h)

Neutralrotstammlösung (Lösung I) mit Kulturmedium (farblos) 1:80 auf eine 50 µg/ml verdünnen, über Nacht bei 37°C inkubiert und 10 min bei 1500 g zentrifugiert (der Überstand wird weiterverwendet)

Medium absaugen, mit verdünnter Neutralrotlösung 200 µl/ Well beschicken und 3 h bei 18°C inkubieren und anschließend Neutralrotlösung absaugen

Zellen + 200 µl/ Well Formaldehydlösung (Lösung II) und 1-2 min waschen und fixieren, anschließend Lösung absaugen

Zellen + 200 µl/ Well Essigsäure (Lösung III), 30 min schütteln (SLT Shaker) und bei $\lambda = 550$ nm vermessen

11.5.4 Hautpräparation

Zur Gewinnung der Hautpräparate wurden haarlose Mäuse verwendet. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet und ein großes Hautstück (ca. 2•3 cm) der Rückenpartie herauspräpariert. Das Hautstück wurde bei 100 % relativer Luftfeuchte und 4 °C maximal 12 h (Stratum corneum nach oben auf mit isoton. Puffer getränkten Zellstoff) gelagert. Für die Messungen wurden die benötigten Probenstücke mit einem Skalpell abgetrennt und auf eine Quarzflachzelle (für X-ESR-Band-Tomographie) bzw. ein Deckgläschen (für S-Band-ESR-Band-Spektroskopie) aufgebracht.

11.6 subzelluläre Fraktionen der Rattenleber

11.6.1 Zellaufschluß und Gewinnung subzellulärer Fraktionen

Unter Gewebeaufschluß versteht man die Freisetzung von Zellen, die in einem Gewebeverband fixiert sind. Der Gewebeaufschluß ist für die nachfolgende Homogenisierung (s. u.) notwendig, da andernfalls die Zellen bei dem hohen Druck so durch das Netzwerk des Bindegewebes hindurchgepreßt werden, daß nicht nur die Zellmembranen, sondern auch andere subzelluläre Organellen (Kerne, Lysosomen) unkontrolliert zerstört werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine Zerkleinerung des Gewebes durch Zerschneiden.

Der Zellaufschluß hatte die Zerstörung der Zellmembran (Zytolyse) und die Freisetzung der subzellulären Organellen zum Ziel. Die Wahl des Aufschlußverfahrens richtete sich nach der Fragestellung (z.B. die Gewinnung intakter Organellen), der Gewebeart (Anteil des Bindegewebes oder isolierte Zellen) und dem Charakter der Zellbegrenzungen (der Aufschluß von Pilzzellen, wie bei *Cunninghamella elegans* und *Cunninghamella echinulata*, erfordert wegen der vorhandenen Zellwände drastischere Methoden als der Aufschluß tierischer Zellen).

Für die schonende Homogenisierung der Rattenleber unter weitgehendem Erhalt der Zellorganellen wurde der Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM verwendet: Dieser besteht aus einem zylindrischen Glasgefäß, in dem ein genau eingepaßter Teflon- oder Glasstempel rotiert. Beim Homogenisieren wurde der rotierende Stempel auf- und abbewegt (6 Zyklen bei einer Umdrehung von 1000 U/ min). Die dabei wirksam werdenden Scherkräfte führen zur Zerstörung der Zellmembranen und zum Zerreißen der Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Letztere bilden dabei kleine Vesikel, die gemeinsam mit den Ribosomen die Mikrosomenfraktion darstellen. Die bei der Homogenisation auftretende Reibungswärme wurde durch Eiskühlung abgeführt.

Als weitere Zellaufschlußverfahren wurden eingesetzt: (i) die Ultraschallbehandlung zur Gewinnung submitochondrialer Partikel und zum Aufschluß von Submerskulturen des Pilzstammes *Cunninghamella elegans*; (ii) das mechanische Zerreiben mit Seesand im

Mörser nach Einwirkung von flüssigem Stickstoff ebenfalls zum Aufschluß von Cunninghamella und zur Probenvorbereitung bei der Analytik von Metaboliten in HaCaT-Zellen; (iii) das wiederholte Einfrieren und Auftauen zur Zytolyse von HaCaT-Zellen.

Für die Gewinnung von subzellulären Fraktionen der Leber wurden männliche Wistar-Ratten durch Halsschnitt bzw. mit Hilfe einer speziellen Guillotine getötet und entblutet. Die Leber wurde sofort entnommen und mit 50 ml eiskaltem isotonischen Phosphatpuffer (pH = 7,4) bzw. Lösung IV (siehe 11.6.3) mehrfach gewaschen bis die Waschflüssigkeit ungefärbt und klar blieb. Anschließend wurde die Leber mit Fließpapier abgetrocknet und auf einem gekühlten Uhrglas gewogen. Mit einer Schere dann in ca. 30 ml Lösung IV in kleine Stücke geschnitten und mit Hilfe eines Glashomogenisators nach Potter-Elvehjem mit Teflon- bzw. Glaspistill erfolgte die Homogenisation (6 Auf- und Abwärtsbewegungen mit 1000 - 1500 U/ min). Falls notwendig wurden die Homogenatportionen in einem eisgekühlten Becherglas gepoolt. Das gewonnene Homogenat wurde anschließend bei 1000•g in einer Kühlzentrifuge 10 min zentrifugiert, um vollständige Zellen, größere Zellbruchstücke und Zellkerne zu entfernen. Die eigentliche Fraktionierung erfolgt nach dem oben beschriebenen Schema mit einer Kühlzentrifuge bei 0- 4 °C. Es wurden jeweils 4 ml Rohhomogenat für Enzymaktivitätsbestimmungen zurückgestellt.

Zur Gewinnung der Mitochondrien wurde der Überstand 30min bei 9000•g und 4°C zentrifugiert. Die Reinigung der Mitochondrienfraktion erfolgte durch dreimaliges resuspendieren des Sedimentes in Saccharoselösung (250 mmol•l⁻¹; MgCl₂ 3 mmol•l⁻¹; Tris-HCl-Puffer pH = 7,6). Der so gewonnene 9000•g Überstand wurde zur Isolierung der Mikrosomen 60 min bei 4°C in einer Ultrazentrifuge bei 100000•g zentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Zytosol dekantiert, die Mikrosomen mit Lösung IV und mittels eines Vortexers[®] resuspendiert und nochmals zentrifugiert.

Der Überstand enthält hauptsächlich die Bestandteile des Zytosols. Die Fraktionen kamen in der Regel unmittelbar nach ihrer Isolierung als Enzymquelle zum Einsatz. Die Inkubationsansätze enthielten neben den untersuchten Nitroxiden bzw. Inhibitoren jeweils noch NADP (1,5 mmol•l⁻¹), Glucose-6-phosphat (6 mmol•l⁻¹), Glucose-6-P-Dehydrogenase E.C.1.1.1.49 (Leuconostoc mesenteroides, 200 U), Magnesiumchlorid (10 mmol•l⁻¹) und Nicotinsäureamid (10 mmol•l⁻¹). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Assays von BioRad (modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford mit Coomassie-Blue) bei $\lambda = 595$ nm bestimmt. Diese Farbstoffbindungsmethode besitzt einen Extinktionskoeffizienten ϵ_{595} von 81 ml/ (mg•cm) und weist Nachweisempfindlichkeiten von 1-15 µg auf [252].

Für die anschließenden Untersuchungen zur Enzymverteilung wurden das Mitochondrien- und Mikrosomensediment werden jeweils in 4 ml Pufferlösung I suspendiert und (wie auch 4 ml des Rohhomogenates) durch Ultraschallbehandlung (1 min, 30 W/cm²) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Nach dem Partikelauflösung wurden die Proben 30 min bei 10000•g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dekantiert (Proteinextrakt) und diente neben dem zytosolischen Überstand zur Aktivitätsbestimmung der Leitenzyme.

Die submitochondrialen Partikel (SMP) wurden durch Digitoninaufschluß (Digitoninkonzentration 75 µg/ mg Protein) der äußeren Membran des Mitochondriums und anschließende Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, 6•30 s unter Eiskühlung, Leistung 25 W) der so gewonnenen Mitoplasten aus Rattenlebermitochondrien isoliert (Ultrazentrifuge 60 min bei 100000 •g, 4 °C). Die Proteinendkonzentration betrug bei allen Experimenten 10 mg/ ml.

Differentialzentrifugation Die hier durchgeführten Arbeiten wurden nach dem folgendem Schema (Abbildung 114) durchgeführt, wobei auf eine weitergehende Auftrennung von Lysosomen und Mitochondrien mittels Zentrifugation im Dichtegradienten verzichtet wurde.

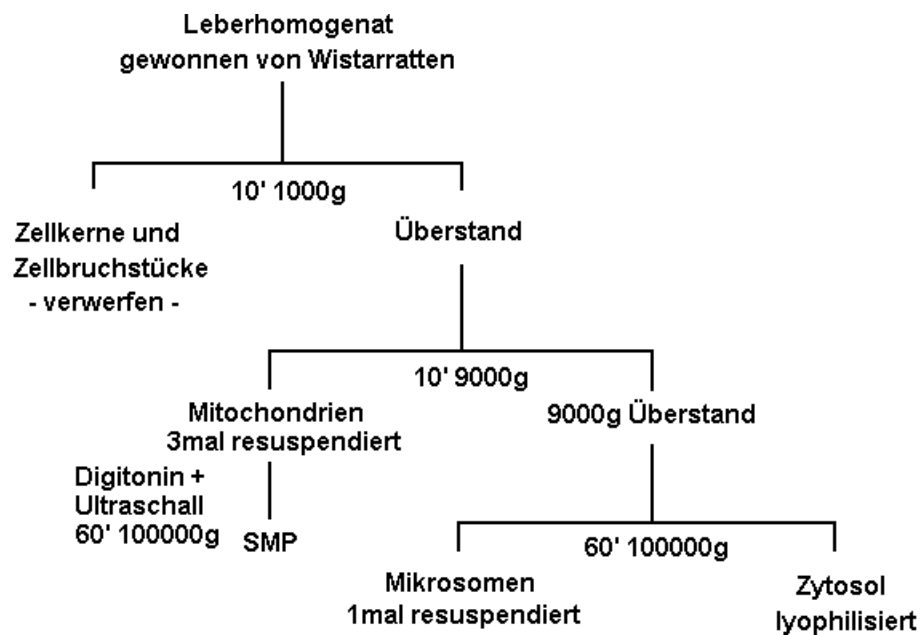


Abbildung 114: Verwendetes Zentrifugationsschema zur Gewinnung subzellulärer Fraktionen der Rattenleber.

11.6.2 Beurteilung der Reinheit von isolierten Zellfraktionen

Hierzu wurden die Aktivitäten ausgewählter Enzyme bestimmt (*Leit- bzw. Markerenzyme*), die weitgehend spezifisch in bestimmten Organellen lokalisiert sind und zugleich ein brauchbares Kriterium für die Qualität des Zellaufschlußverfahrens darstellen. Folgende Leitenzyme wurden untersucht.

Mitochondrien: Glutamat-dehydrogenase (E.C. 1.4.1.3.); Saure Phosphatase (E.C. 3.1.3.2.)

Mikrosomen: Glucose-6-Phosphatase (E.C. 3.1.3.9.)

Zytosol: Malatenzym (E.C. 1.1.1.40.)

Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß die einzelnen Leitenzyme nicht ausschließlich in einer subzellulären Fraktion vorkommen und Inaktivierungsprozesse während der Präparation auftreten können. Die Bestimmung der Enzyme bietet damit nur einen Anhaltspunkt für die Qualität der durchgeführten Isolierung der subzellulären Fraktionen.

Verwendete Lösungen

Lösung I. Tris-HCl-Puffer ($0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 7,6)

Lösung II. Tris-HCl-Puffer ($0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 7,0)

Lösung III. Tris-HCl-Puffer ($0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 7,6; mit 3 mmol/l MgCl_2)

Lösung IV. Saccharose-Lsg. ($0,32 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Puffer III

Lösung V. Saccharose-Lsg. ($0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Puffer III mit 1 mM Dithiothreitol

Lösung VI. Saccharose-Lsg. ($0,8 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Puffer II

Die Leberpräparation, die Homogenisation und die Zentrifugationsschritte wurden unter permanenter Kühlung (Temperatur ca. 4°C) durchgeführt.

Enzymatische Bestimmungen Die Aktivitätsbestimmungen der folgenden Enzyme wurden jeweils in den Proteinextrakten der Mitochondrien-, Mikrosomenfraktion und des Rohhomogenates sowie im Zytosol vorgenommen.

Glutamatdehydrogenase

Lösungen:

Triethanolamin-Puffer ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 8,0): 748 mg Triethanolamin (Dichte = 1,1242) und 5,0 ml 1 N HCl wurden mit 2 N NaOH auf pH 8,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

α -Ketoglutarat (Na-Salz) ca. $0,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$: 146 mg α -Ketoglutarat wurde in 1 ml Aqua dest. gelöst, mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl auf pH 6,8 eingestellt und mit Aqua dest. auf 2,5 ml aufgefüllt.

Ammoniumacetat ($3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$): 2,35 g Ammoniumacetat wurde in 10 ml Aqua dest. Gelöst.

NADH ($\sim 0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$): 15 mg NADH- Na_2 wurde in 1,5 ml 1 % NaHCO_3 gelöst.

EDTA ($0,26 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$): 100 mg EDTA/ ml Aqua dest. Eingesetzt.

Durchführung:

Meßansatz: In eine Küvette wurden in der aufgezeigten Reihenfolge pipettiert:

1,79 ml Puffer + 0,03 ml NADH + 0,02 ml EDTA ($\rightarrow 25^\circ \text{C}$) + 0,07 ml Ammoniumacetat + 0,05 ml Probe (Endvolumen 2,0 ml; $d = 10$).

Nach intensiven Mischen wurde eine mögliche Extinktionsabnahme bei 340 nm abgewartet und mit 0,04 ml α -Ketoglutarat die Reaktion gestartet. Über einen Zeitraum von 3 min wurde die Extinktionsabnahme gemessen und daraus die Extinktionsänderung pro min ermittelt.

Malatenzym

Lösungen:

Tris-HCl-Puffer ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 7,2): 0,607 g Tris wurde in 44,2 ml 0,1 N HCl gelöst und mit Aqua dest. auf 100ml aufgefüllt.

MgCl_2 -Lösung : 40,6 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ wurden in 10 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) gelöst.

L-Malat ($0,13 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 7,2): 124,8 L-Malat mg wurden mit ca. 3 ml Aqua dest. vermischt, mit 1 N NaOH auf pH 7,2 eingestellt und anschließend mit Tris-HCl-Puffer auf 10 ml aufgefüllt.

NADP^+ ($\sim 0,018 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$): 15 mg NADP wurden pro ml Aqua dest. eingesetzt

Durchführung:

Meßansatz: In eine Küvette wurden in der aufgezeigten Reihenfolge pipettiert

0,9 ml Puffer + 0,25 ml MgCl_2 -Lösung ($\rightarrow 25^\circ \text{C}$) + 0,25 ml Malatlösung + 0,5 ml Probe (Endvolumen: 2 ml; $d = 10 \text{ mm}$).

Nach dem Mischen wurde eine mögliche Extinktionszunahme bei 340 nm abgewartet und die Reaktion mit 0,1 ml NADP^+ -Lösung gestartet. Über einen Zeitraum von 3 min wurde die Extinktionszunahme gemessen und daraus die Extinktionsänderung pro min ermittelt.

Saure Phosphatase

Lösungen:

Citratpuffer ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 4,8, 5,5 mmol/l p-Nitrophenylphosphat enthaltend): 0,41 g Citronensäure, 1,125 g Na-Citrat, 165 mg p-Nitrophenylphosphat/100 ml Aqua dest.

Meßansatz:

Zusätze	Meßwert	Leerwert
Puffer-Substrat-Lösung	1 ml 5 - 10 min temperiert (37°C)	1 ml
Extrakt	0,2 ml grmischt, genau 30 min inkubiert (37°C)	-
0,1 N NaOH	4 ml	4 ml
Probe		0,2 ml

Anschließend wurde die Extinktion des entstandenen Nitrophenols (Meßwert gegen Leerwert) bei 405 nm gemessen.

Glucose-6-phosphatase

Lösungen:

Saccharose/EDTA-Lösung ($0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$): 0,372 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in Saccharoselösung (85,6 g/l) gelöst, mit 0,1 N HCl auf pH 7,0 eingestellt und anschließend mit Saccharoselösung auf 1 l aufgefüllt.

Glucose-6-phosphat ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$): 0,336 g Glucose-6-phosphat- Na_2 wurden in Aqua dest. gelöst und auf 10 ml aufgefüllt.

Citratpuffer ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 6,5): 2,1 g Citronensäure H_2O wurden in ca. 50 ml Aqua dest. gelöst, mit 30 %iger NaOH auf pH 6,5 eingestellt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Phosphat-Standardlösung ($1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$): 2,041 g KH_2PO_4 wurden in Aqua dest. gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. 1 ml davon wurde mit Lösung 1 im Verhältnis 1 : 100 verdünnt.

Ascorbinsäure/TCA (2 %/10 %): 50 g TCA wurden in Aqua dest. gelöst, anschließend 10 g Ascorbinsäure zugesetzt und auf 500 ml aufgefüllt.

Ammoniummolybdat (1 %): 10 g Ammoniummolybdat wurde in Aqua dest. gelöst und anschließend auf 1 l aufgefüllt.

Arsenit/Citrat (je 2 %): 20 g Na-Citrat und 20 g Na-Arsenit wurden in Aqua dest. gelöst, 20 ml Eisessig wurden zugeben und mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

In vier Zentrifugenröhrchen wurden folgende Zusätze einpipettiert:

Meßwert (Angaben in ml)	Leerwert	Standardwert	Kontrollwert	
Saccharose/EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1
Glucose-6-phosphat	0,1	0,1	0,1	0,1
Puffer	0,1	0,1	0,1	0,1
gemischt, temperiert (37°C)				
Probe	0,1	-	-	0,1 ¹
Glucose-6-phosphat	-	0,1	-	-
Phosphat	-	-	0,1	-
gemischt, je nach Aktivität der Probe 5 - 10 min inkubiert				
Ascorbinsäure/TCA	2,0	2,0	2,0	2,0
gemischt, 3 min bei 3000 x g zentrifugiert				

Die Probe wurde im Kontrollansatz erst nach Zugabe der Ascorbat/TCA-Lösung zugesetzt!

Jeweils 1 ml des Überstandes wurden mit 0,5 ml Molybdatlösung (Lösung 6) gemischt. Danach wurde 1,0 ml Arsenit/Citrat (Lösung 7) zugesetzt und nach erneutem Mischen inkubiert (15 min bei 37°C). Anschließend wurde die Extinktion bei 700 nm gegen den Leerwert ($d = 10 \text{ mm}$) gemessen.

Das enzymatisch freigesetzte Phosphat errechnete sich durch Bezug auf den Standardwert ($0,15 \mu\text{mol P}_{\text{an}}$ im Test) wie folgt:

$$c = \frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Kontrolle}}}{E_{\text{Standard}}} \cdot 0,15 \text{ (}\mu\text{mol/Testansatz)}$$

11.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Auswertung wurden die gemessenen Aktivitäten auf die Proteinkonzentration bezogen. Dafür wurde eine modifizierte Bradford-Methode eingesetzt (Protein-Testkit von BIORAD®). Diese Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe Empfindlichkeit aus und ist gegen die Einflüsse von Störsubstanzen, wie sie z.B. Pufferbestandteile oder bestimmte Detergenzien darstellen, wenig störanfällig.

11.8 In-vitro-Bestimmung der Proteinbindung

Die In-vitro-Proteinbindung von Nitroxiden an Serumalbumin wurde mittels Ultrazentrifugation bestimmt. Dazu wurden die Nitroxide in einer Konzentration von $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ in isotonischen Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7,4$) gelöst. Diese Stammlösung wurde mit einer 8 %igen Albuminlösung (Humanserumalbumin 64 kDa, gelöst in Phosphatpuffer) im Verhältnis von 1:1 verdünnt und 120 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Endkonzentration betrug somit $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ in 4 %iger Albuminlösung. Für die Filtration wurden Zentrifugal-Ultrafilter Centrisart® I (SARTORIUS) mit einer Trennleistung von 20000 Dalton zum Einsatz. Die Zentrifugationszeit betrug 15 min bei 3000 U/min. Anschließend wurde die Konzentration der Nitroxide im wässrigen Überstand (freies Nitroxid c_f) mit Hilfe der ESR bestimmt. Die Konzentration an proteingebundenen Nitroxid c_g ergibt sich aus der Differenz aus der eingesetzten Gesamtnitroxidkonzentration c_{total} und c_f .

11.9 Massenspektren von Referenzsubstanzen, Reaktionsprodukten und Metaboliten

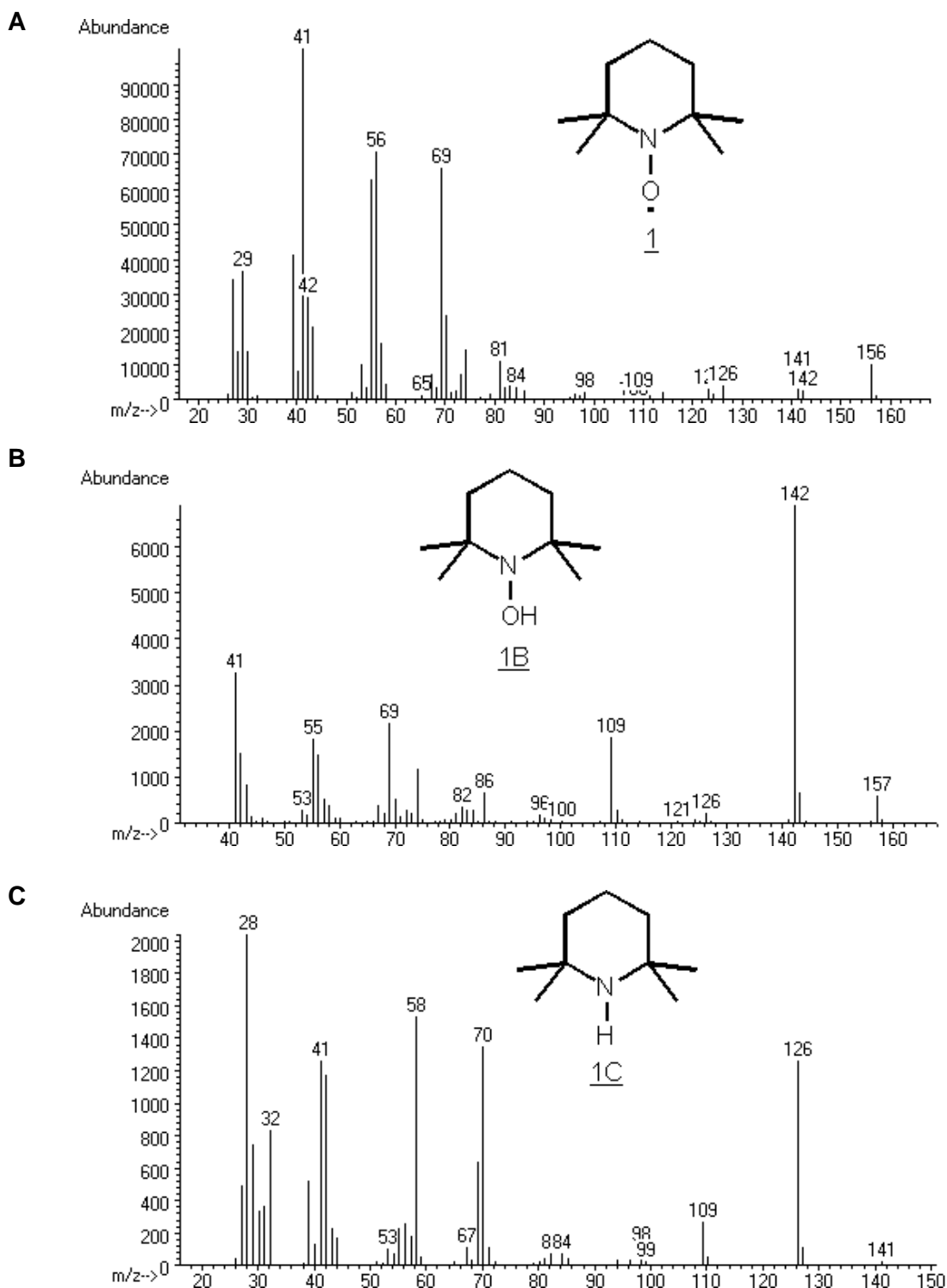


Abbildung 115: MS-Fragmentierung vom Nitroxid (A) **1** ($M = 156$ g/ mol), dem korrespondierenden Hydroxylamin (B) **1B** ($M = 157$ g/ mol) und dem sterisch gehinderten sekundären Amin (C) **1C** ($M = 141$ g/ mol) nach EI.

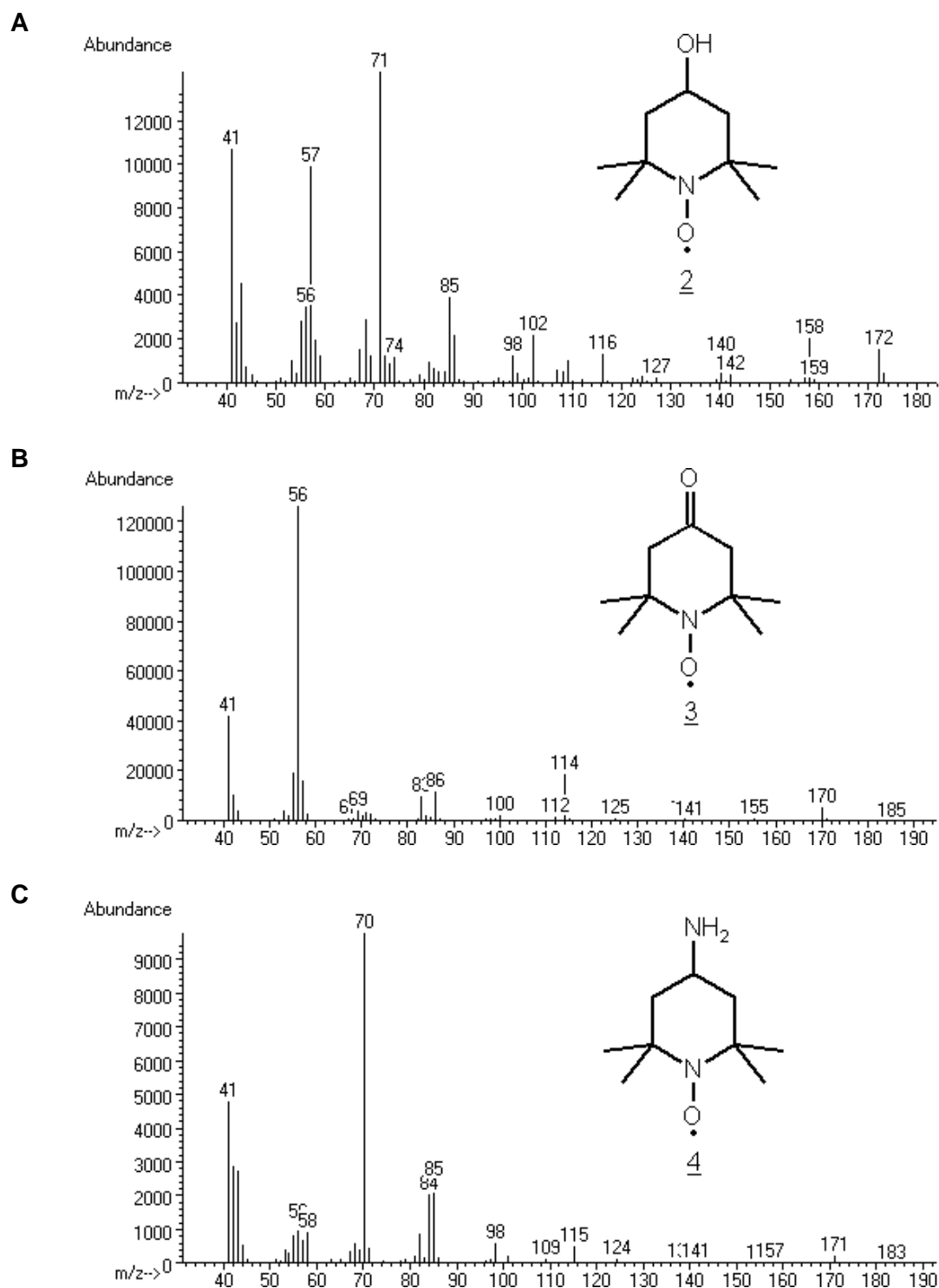


Abbildung 116: MS-Fragmentierung von (A) 2 (M = 172 g/ mol), (B) 3 (M = 170 g/ mol) und (C) 4 (M = 171 g/ mol) nach EI.

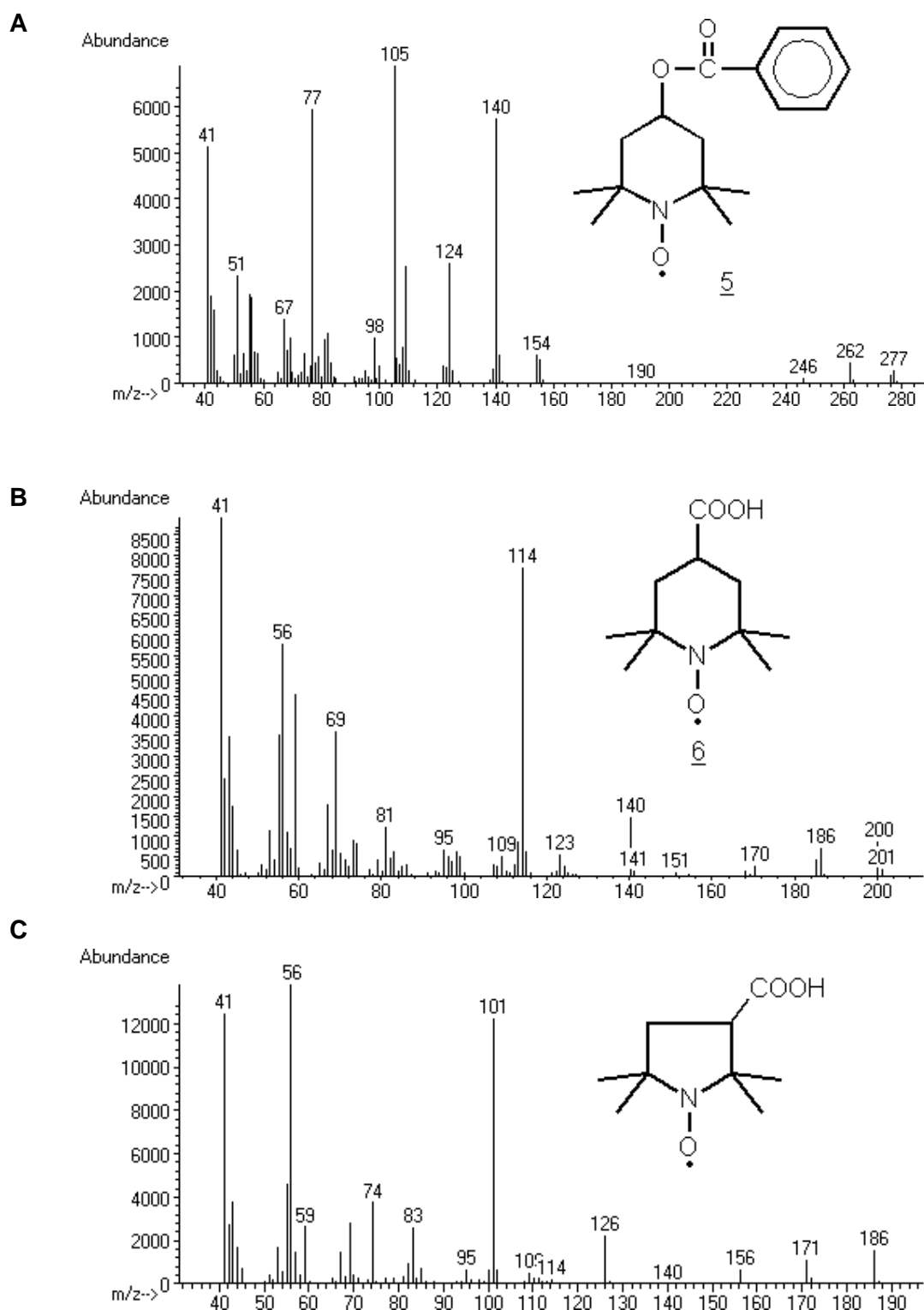


Abbildung 117: MS-Fragmentierung von (A) 6 (M = 200 g/ mol), (B) 5 (M = 276 g/ mol) und (C) 9 (M = 186 g/ mol) nach EI.

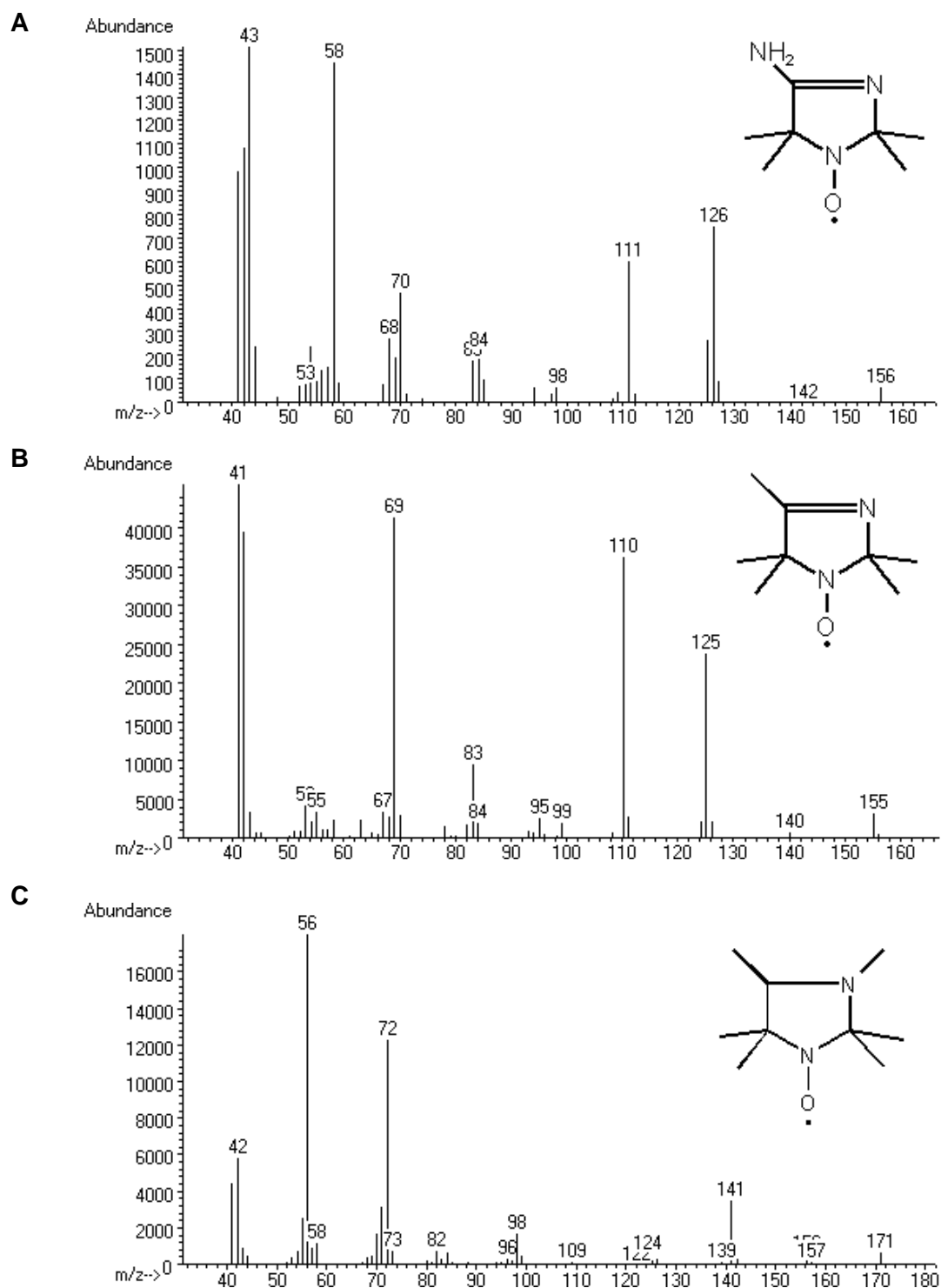


Abbildung 118: MS-Fragmentierung der Fünfringnitroxide; (A) **11** ($M = 156$ g/ mol), (B) **12** ($M = 155$ g/ mol) und (C) **13** ($M = 171$ g/ mol) nach EI.

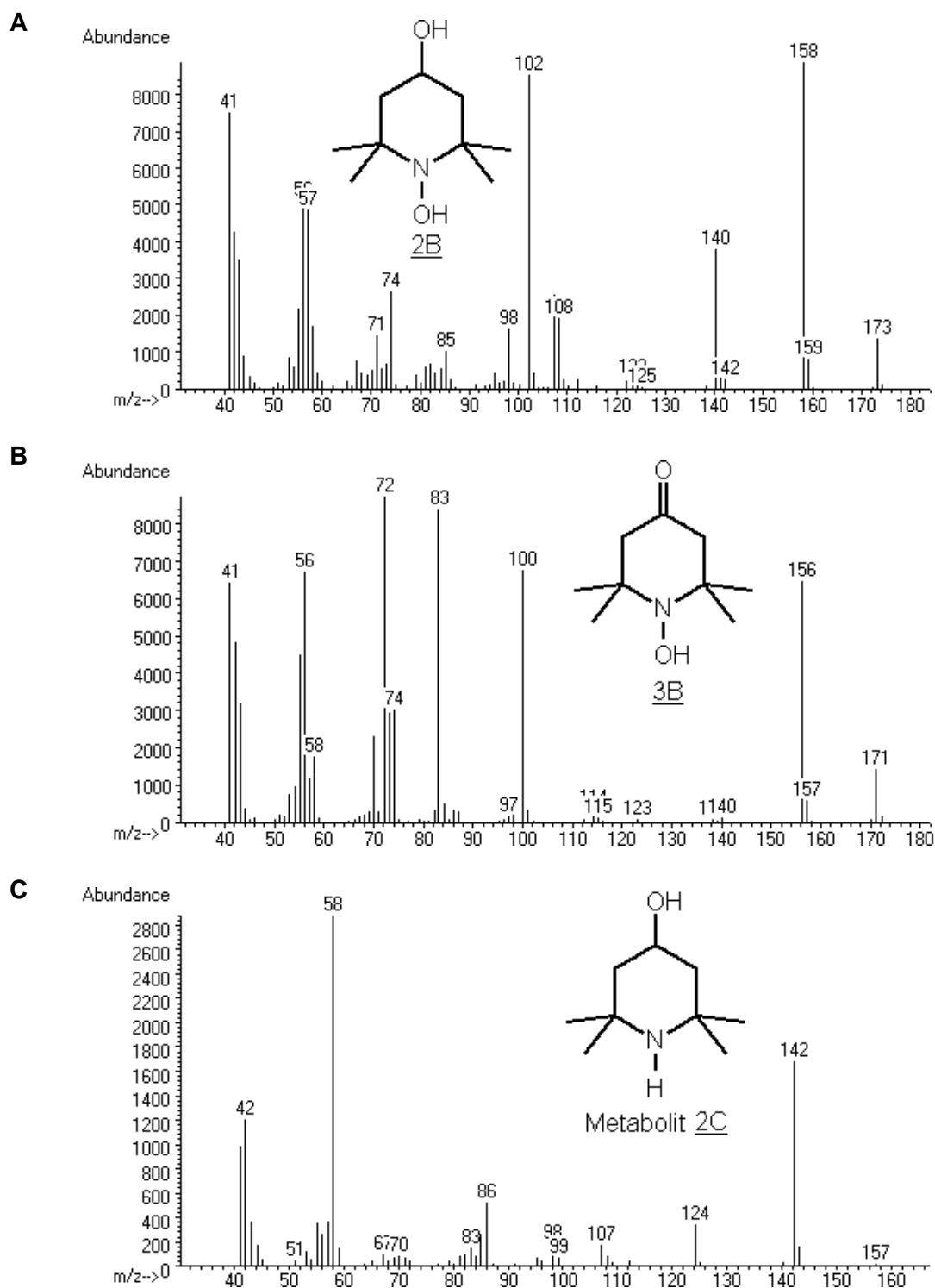


Abbildung 119: MS-Fragmentierung von Reaktionsprodukt bzw. Metabolit (A) **2B** (M = 173 g/ mol), (B) **3B** (M = 171 g/ mol) und (C) **2C** (M = 157 g/ mol) nach EI.

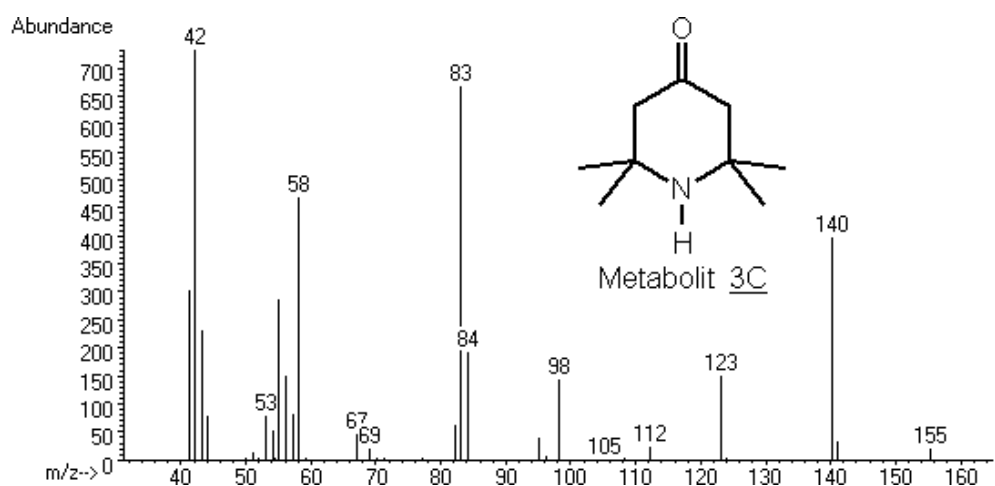


Abbildung 120: MS-Fragmentierung von Metabolit **3C** (M = 173 g/ mol) nach EI.

Abkürzungsverzeichnis

TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPON	4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPAMIN	4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
Carboxy-TEMPO	4-Carboxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
CAT-1	4-Tetramethylamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPOL-benzoat	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-benzoat
TEMPOH	1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
TEMPOLH	1,4-Dihydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
PCA	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidin-1-oxyl
AT	4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-1-oxyl
HM	2,2,3,4,5,5-Hexamethyl-3-imidazolidin-1-oxyl
002A/92	2,2,4,5,5-pentamethyl-3-imidazolin-1-oxyl
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
Metrapon	2-Methyl-1,2-di-3-pyridinyl-1-propanon
Azelainsäure	Heptandicarbonsäure (Nonandisäure)
NEM	N-Ethylmaleinimid
HQNO	2-Heptyl-4-hydroxychinolin-N-oxid
TTFA	4,4,4-Trifluoro-1-[2-thienyl]-1,3-butandion
Deferoxamin	30-Amino-3,14,25-trihydroxy-3,9,14,20,25-pentaazatriacontan-2,10,13,21,24-pentaon - (Desferal [®])
Triton X-100	Polyoxyethylen(10)octylphenylether
TR	Thioredoxinreduktase
SOD	Superoxiddismutase
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie – Massenspektrometrie
ESR	Elektronenspinresonanz
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction)
PDMS	Polydimethylsiloxan
DPP	Differentielle-Puls-Polarographie
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration mit 50% Effekt
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
K _m	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
a _N	Stickstoffhyperfeinkopplungskonstante
R _S	Peakaufklärung
S/N	Signal to noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)

Publikationsliste

Originalarbeiten

C. Kroll, K. Mäder, R. Stößer, H.-H. Borchert: Nondestructive determination of pH values in nontransparent W/O systems by means of EPR spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **3**, 21-26 (1995).

H.H. Borchert, K. Mäder, R. Stößer, C.Kroll: Free radical intermediates in fungal metabolism as a model of mammalian drug metabolism. *Magnetic Resonance in Medicine (Japan)* **6**, 375-377 (1995).

K. Osterloh, C. Kroll, K. Mäder, H.-H. Borchert, B. Sammler, C. Kirmse: HPLC und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie on-line gekoppelt. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **42**, 24-25 (1998).

C. Kroll, H.-H. Borchert: Untersuchungen zum Einsatz der Festphasenmikroextraktion SPME bei der Probenvorbereitung aus einer komplexen biologischen Matrix im Rahmen von Biotransformationsstudien. *Die Pharmazie* **53**, 172-177 (1998).

C. Kroll, H.-H. Borchert: Metabolism of the stable nitroxyl radical 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-N-oxyl (TEMPONE). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **8**, 5-9 (1999).

C. Kroll, A. Langner, H.-H. Borchert: Nitroxide Metabolism in the Human Keratinocyte Cell Line HaCaT. *Free Radical Biology & Medicine* **26**, 850-857 (1999).

C. Kroll, K.-H. Schwarz, P. Surmann, H.-H. Borchert: Differential pulse polarography and electron spin resonance spectroscopy of nitroxyl free radicals used as ESR spin probes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **48**, 233-236 (1999).

C. Kroll, K. Osterloh, K. Mäder, W. Wohlauf, H.-H. Borchert: On-line coupled HPLC-ESR: application for separation and characterization of nitroxide spin probes. *Die Pharmazie* (angenommen zur Publikation 1999).

Kurzmitteilungen, Posterabstracts und Proceedings

C. Kroll, K. Mäder, R. Stößer, H.-H. Borchert: pH-Wertbestimmungen in W/O-Emulsionen und biologische abbaubaren Polymeren mittels Elektronenspinresonanz-(ESR)-Spektroskopie. *PharmUZ* **23**, 230-231 (1994).

K. Mäder, R. Stößer, C. Kroll, H.-H. Borchert: Detektion metabolischer Prozesse durch rapid freezing ESR ≥ 4 Kelvin. *PharmUZ* **23**, 243-244 (1994).

C. Kroll, K. Mäder, R. Stößer, H.-H. Borchert: Direct and nondestructive measurement of proton activity inside nontransparent W/O-systems and biodegradable polymers by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2**, 157 (1994).

C. Kroll, K. Mäder, H.-H. Borchert: Untersuchungen zur Biotransformation von Piperidin-Nitroxylradikalen. *PharmUZ* **25**, 142 (1996).

C. Kroll, P. Witte, H.-H. Borchert: Untersuchungen zu Einsatzmöglichkeiten der Festphasenmikroextraktion (SPME) bei der Probenvorbereitung aus einer komplexen

biologischen Matrix. *PharmUZ* **27**, 33 (1997).

C. Kroll, K. Mäder, W. Wohlauf, H.-H. Borchert: On-Line Coupled HPLC-ESR: Application for Separation and Characterization of Nitroxide Spin Probes. *Proceedings der II. International Conference on Bioradicals -ICB-*, 1997 in Yamagata/Japan.

C. Kroll, H.-H. Borchert: Metabolism of Nitroxide Spin Probes with Piperidine Structure in a human Keratinocyte Cell Line. *Proceedings der II. International Conference on Bioradicals -ICB-*, 1997 in Yamagata/Japan.

C. Kroll, W. Herrmann, R. Stößer, K. Mäder, H.-H. Borchert: Noninvasive investigation of stability and transdermal penetration of liposomes by application of Electron Spin Resonance (ESR) tomography. *Die Pharmazie* **53** (Supplement 1), 23 (1998).

C. Kroll, K. Osterloh, K. Mäder, H.-H. Borchert On-line coupled HPLC-ESR: Application for separation and characterization of organic radicals. *Archiv der Pharmazie – Pharmaceutical and Medicinal Chemistry* **331**, Suppl. 2, 40 (1998).

Vorträge

C. Kroll, K. Mäder, R. Stößer, H.-H. Borchert: pH-Wertbestimmungen in W/O-Emulsionen und biologische abbaubaren Polymeren mittels Elektronenspinresonanz-(ESR)-Spektroskopie. Vortrag auf der 6. Frühjahrstagung der DPhG, Bernkastel-Kues, 9-11.2.1994.

C. Kroll, K. Mäder, H.-H. Borchert: Untersuchungen zur Biotransformation von Piperidin-Nitroxylradikalen. Vortrag auf der 8. Frühjahrstagung der DPhG, Kiel, 14-16.3.1996.

C. Kroll, K. Mäder, W. Wohlauf, H.-H. Borchert: On-line coupled HPLC-ESR: Application for separation and characterisation of nitroxide spin probes. Vortrag auf der 2nd International Conference on Bioradicals detected by ESR-Spectroscopy, Yamagata, Japan, 12-16.10.1997.

C. Kroll, W. Herrmann, R. Stößer, K. Mäder, H.-H. Borchert: Nichtinvasive und orts aufgelöste Untersuchungen zur Integrität und dermalen Penetration von Liposomen mittels S-Band-ESR-Spektroskopie und X-Band-ESR-Tomographie. Vortrag auf der Veranstaltung der DPhG (Landesgruppe Berlin-Brandenburg) „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“, Berlin, 29.6.1998.

C. Kroll, A. Langner, H.-H. Borchert: Metabolic pathway of nitroxides in the human keratinocyte cell line HaCaT investigated by ESR and additional techniques such as GC, GC-MS and NMR. Vortrag auf dem Workshop "On in vivo EPR and related studies". Dartmouth, USA, 13-18.9.1998.

C. Kroll, W. Herrmann, R. Stößer, H.-H. Borchert, K. Mäder: Direct, Noninvasive and localized measurement of skin pH by electron spin resonance (ESR) imaging. Vortrag von Dr.Mäder auf dem Symposium "The 26th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials and the 2nd Consumer and Diversified Products Conference", Boston, USA, 20-25.6.1999.

Poster

K.Mäder, C. Kroll, R. Stößer, W.Henke, H.-H. Borchert: Purification and characterization of spin adducts by TLC- and HPTLC-techniques. Poster auf dem 4. International Symposium on spin trapping and organic EPR spectroscopy with applications in chemistry, biology and

medicine, Oklahoma City OK, USA, 24-28.10.1993.

H.-H. Borchert, K. Mäder, R. Stößer, C. Kroll: Free radical intermediates in fungal metabolism as a model of mammalian drug metabolism. Poster auf der International Conference on Bioradicals detected by ESR-Spectroscopy, Yamagata, Japan, 12-16.6.1994.

C. Kroll, K. Mäder, R. Stößer, H.-H. Borchert:

Direct and nondestructive measurement of proton activity inside nontransparent W/O-systems and biodegradable polymers by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. Poster auf dem 2nd European Congress of Pharmaceutical Sciences, Berlin, 29.9.-1.10.1994.

C. Kroll, P. Witte, H.-H. Borchert: Untersuchungen zu Einsatzmöglichkeiten der Festphasenmikroextraktion (SPME) bei der Probenvorbereitung aus einer komplexen biologischen Matrix. Poster auf der Jahrestagung der DPhG, Berlin, 27-28.9.1996.

C. Kroll, K. Osterloh, K. Mäder, W. Wohlauf, H.-H. Borchert: On-line HPLC-ESR Kopplung - Separierung und Charakterisierung stabiler Radikale. Poster auf der 9. Frühjahrstagung der DPhG, Würzburg, 13-16.3.1997.

C. Kroll, H.-H. Borchert: Metabolism of nitroxide spin probes with piperidin structure in a human keratinocyte cell line. Poster auf der 2nd International Conference on Bioradicals detected by ESR-Spectroscopy, Yamagata, 12-16.10.1997.

C. Kroll, W. Herrmann, R. Stößer, K. Mäder, H.-H. Borchert: Noninvasive investigation of stability and transdermal penetration of liposomes by application of Electron Spin Resonance (ESR) tomography. Poster auf dem 1. European Graduate Student Meeting, Frankfurt/ M., 20-22.2.1998.

C. Kroll, K.-H. Schwarz, P. Surmann, H.-H. Borchert: Electrochemical reducibility of nitroxyl free radicals used as ESR spin probes. Poster auf der European Research Conference - Organic Electrochemistry: Moving Towards Clean and Selective Synthesis der ESF (European Science Foundation), La Londe Les Maures, Frankreich, 15-19.4.1998.

C. Kroll, W. Herrmann, R. Stößer, K. Mäder, H.-H. Borchert: Noninvasive investigation of stability and dermal penetration of liposomes into the skin by application of ESR-spectroscopy and tomography. Poster auf dem Workshop on in vivo EPR and related studies. Dartmouth, USA, 13-18.9.1998.

C. Kroll, K. Osterloh, K. Mäder, H.-H. Borchert: On-line coupled HPLC-ESR: Application for separation and characterization of organic radicals. Poster auf der Jahrestagung der DPhG, Tübingen, 6-8.11.1998.

Lebenslauf

15. Mai 1970	geboren in Berlin-Friedrichshain
1976 - 1986	Besuch der POS "Hanns Eisler" (Berlin - Prenzlauer Berg)
1986 - 1988	Besuch der EOS "Käthe Kollwitz" (Berlin - Prenzlauer Berg) und Abschluß des Abiturs
1988 - 1990	Wehrdienst als Unterfeldwebel (U.a.Z.) in der NaK/ FRR 13/ 3. LVD der NVA (Standort Parchim)

Beruflicher Werdegang:

1990 - 1994	Pharmaziestudium am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin
Nov.1994- April 1995	Praktisches Jahr in der Gallus-Apotheke in Grünberg/ Oberhessen
seit Mai 1995	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin
Januar 1996	Abschluß der Pharmazeutischen Prüfung mit der Gesamtnote <i>sehr gut</i> und Approbation als Apotheker
Febr.- Mai 1997	Forschungsaufenthalt an der Faculty of Pharmaceutical Sciences der Kyushu University (Fukuoka/ Japan) bei Prof. Hideo Utsumi

Praktika:

Febr.- April 1993	Praktikum am Landesuntersuchungsinstitut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin (LAT) bei Prof. Beyer
August 1995	Weiterbildungskurs zum Thema Umweltanalytik am Institut für Angewandte Analytik und Umweltchemie der Humboldt-Universität zu Berlin
April - Juli 1998	Erfolgreiche Teilnahme am Weiterbildungslehrgang „Versuchstiere, Tierversuche und Alternativmethoden“ der ZEBET im BgVV

Erklärung

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, den 10.05.1999

Christian Kroll

Literaturverzeichnis

- 1 Thomas, C.E.; Kalyanaraman, B.: Oxygen Radicals and the Disease Process. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997.
- 2 Morse P.D. II: Use of the spin label TEMPAMINE for measuring the internal viscosity of red blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 1486-1491 (1977).
- 3 Kocherginsky, N.; Swartz, H.M.: *Nitroxide Spin Labels - Reactions in Biology and Chemistry*, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1995.
- 4 Kroll, C.; Mäder, K.; Stösser, R.; Borchert, H.-H.: Direct and continuous determination of pH-values in nontransparent w/o systems by means of epr-spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **3**, 21-26 (1995).
- 5 Berliner, L. J.; Reuben, J.: *Spin Labeling- Theory and Application in Biological Magnetic Resonance*, Plenum Press, New York, London, 1989.
- 6 Mitchell, J.B.; DeGraff, W.G.; Kaufman, D.; Krishna, M.C.; Samuni, A.; Finkelstein, E.; Ahn, M.S.; Hahn, S.M.; Gamson, J.; Russo, A.: Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimic Tempol. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**, 62-70 (1991).
- 7 Finkelstein, E.; Rosen, G.M.; Rauckman, E.J.: Superoxide-dependent reduction of nitroxides by thiols. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 90-98 (1984).
- 8 Mitchell, J.B.; Samuni, A.; Krishna, M.C.; DeGraff, W.G.; Ahn, M.S.; Samuni, U.; Russo, A.: Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* **29**, 2802-2807 (1990).
- 9 Krishna, M.C.; Grahame, D.A.; Samuni, A.; Mitchell, J.B.; Russo, A.: Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 5537-5541 (1992).
- 10 Miura, Y.; Utsumi, H.; Hamada, A.: Antioxidant activity of nitroxyl radicals in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 148-156 (1993).
- 11 Miura, Y.; Utsumi, H.; Hamada, A.: In vivo ESR studies of antioxidant activity on free radical reaction in living mice under oxidative stress. *Free Radic. Res.* **22**, 209-214 (1995).
- 12 Johnstone, P.A.; DeGraff, W.G.; Mitchell, J.B.: Protection from radiation-induced chromosomal aberrations by the nitroxide Tempol. *Cancer* **75**, 2323-2327 (1995).
- 13 Lamperti, A.; Conger, A.; Delaney, I.; Sodicoff, M.: Reduction of radiation-induced hair loss by topical application of radioprotectors. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **20**, 1971-1989 (1994).

- 14 Goffman, T.; Cuscela, D.; Glass, J.; Hahn, S.; Krishna, C.M.; Lupton, G.; Mitchell, J.B.: Topical application of nitroxide protects radiation-induced alopecia in guinea pigs. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **22**, 803-806 (1992).
- 15 Eaton, G.R.; Eaton, S.S.; Ohno, K.: EPR Imaging and in-vivo-EPR, CRC Press, Boca Raton 1991.
- 16 Sentjerc, M.; Pecar, S.; Chen, K.; Wu, M.; Swartz, H.M.: Cellular metabolism of proxyl nitroxides and hydroxylamines. *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 329-335 (1991).
- 17 Giotto, G.J.; Wang, H.H.: Reduction of nitroxide free radicals by biological materials. *Biochem. Biophys. Res. Commms.* **46**, 1576-1580 (1972).
- 18 Swartz, H.M.: Interactions between cells and nitroxides and their implications for their uses as biophysical probes and as metabolically responsive contrast agents for in vivo NMR. *Bull. Magn. Res.* **8**, 172-175 (1986).
- 19 Couet, W.R.; Brasch, R.C.; Sosnovsky, G.; Tozer, T.N.: Factors affecting nitroxide reduction in ascorbate solution and tissue homogenates. *Magn. Reson. Imaging* **3**, 83-88 (1985).
- 20 Eriksson, U.G.; Brasch, R.C.; Tozer, T.N.: Nonenzymatic bio-reduction in rat liver and kidney of nitroxyl spin labels, potential contrast agents in magnetic resonance imaging. *Drug Metab. Dispos.* **15**, 155-160 (1987).
- 21 Kveder, M.; Sentjerc, M.; Schara, M.: Spin probe reduction in cells and tissues. *Magn. Reson. Med.* **8**, 241-247 (1988).
- 22 Couet, W.R.; Eriksson, U.G.; Tozer, T.N.; Tuck, L.D.; Wesbey, G.E.; Nitecki, D.; Brasch, R.C.: Pharmacokinetics and metabolic fate of two nitroxides potentially useful as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Pharm. Res.* **1**, 203-209 (1984).
- 23 Eriksson, U.G.; Ogan, M.D.; Peng, C.-T.; Brasch, R.C.; Tozer, T.N.: Metabolic fate in the dog of the nitroxide moiety in a compound with potential utility as a contrast agent in MRI. *Magn. Reson. Med.* **5**, 73-77 (1987).
- 24 Aurich, H.G.: Nitroxides. In: *Nitrones, Nitronates and Nitroxides*. Breuer, E.; Aurich, H.G.; Nielsen, A. (Eds.), 313-370, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
- 25 *Europäisches Arzneibuch (Amtliche Ausgabe)*, **Band 1**, 35, Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart, 1974.
- 26 *ICH-Guideline Q2A: Validation of Analytical Methods (Definitions and Terminology)*. 1994.
- 27 *ICH-Guideline Q2B: Analytical Validation – Methodology*. 1996.
- 28 Ermer, J.; Kibat, P.-G.: Validierung analytischer Verfahren. 1.Teil: Anforderungen bei der Zulassung von Arzneimitteln. *PZ Prisma* **4**, 239-243 (1997).

-
- 29 Blume, H.; Midha, K. (Hrsg.): *BIO-International 2*. Medpharm, Stuttgart, 1995.
- 30 Fuchs, J.; Nitschmann, W.H.; Packer, L.; Hankovszky, O.H.; Hideg, K.: pKa values and partition coefficients of nitroxide spin probes for membrane bioenergetics measurements. *Free Rad. Res. Commun.* **10**, 315-323 (1990).
- 31 Zenser, T.V.; Petrella, V.J.; Hughes, F.: Spin-labeled stearates as probes for microenvironment of murine thymocyte adenylate cyclase-cyclic adenosine 3':5'-monophosphate system. *J. Biol. Chem.* **251**, 7431-7436 (1976).
- 32 Bayer, E.; Albert, K.; Nieder, M.; Grom, E.; Keller, T.: On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance. *J. Chromatogr.* **186**, 497-507 (1979).
- 33 Sugata, R.; Iwahashi, H.; Ishii, T.; Kido, R.: Separation of polyunsaturated fatty acid radicals by high performance liquid chromatography with electron spin resonance and ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **487**, 9-16 (1989).
- 34 Iwahashi, H.; Ikeda, A.; Negoro, Y.; Kido, R.: Detection of radical species in heamatin-catalysed retinoic acid 5,6-epoxidation by using h.p.l.c.-e.s.r. spectrometry. *Biochem. J.* **236**, 509-514 (1986).
- 35 Ishii, T.; Iwahashi, H.; Sugata, R.; Kido, R.: Formation of hydroxanthomatin-derived radical in the oxidation of 3-hydroxykynurenine. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 616-622 (1992).
- 36 Iwahashi, H.; Parker, C.E.; Tomer, K.B.; Mason, R.P.: Detection of the ethyl- and pentyl-radical adducts of α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron in rat-liver, microsomes treated with ADP, NADPH and ferric chloride. *Free Rad. Res. Comm.* **16**, 295-301 (1992).
- 37 Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Fujita, M.; Ono, S.; Suzuki, M.; Takitani, S.; Sonoda, M.; Sakagashi, Y.: Slow analyses of UV-irradiated chemicals by chemiluminescence and ESR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **261**, 39-43 (1992).
- 38 Osterloh, K.; Kroll, Ch.; Mäder, K.; Borchert, H.-H.; Sammler, B.; Kirmse, C.: HPLC und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie on-line gekoppelt. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **42**, Heft 1/98, 24-25 (1998).
- 39 Gallez, B.; Lacour, V.; Demeure, R.; Debuyst, R.; Defehet, F.; Keyser, J.L.; Dumont, P.: Spin labeled arabinogalactan as MRI contrast agent. *Magn. Reson. Imaging* **12**, 61-69 (1994).
- 40 Morrison, A.; Davies, A.P.: Mass spectrometry of piperidine nitroxides - a class of stable free radicals. *Org. Mass Spectrometry* **3**, 353-366 (1970).
- 41 Ivanovskaya, L.J.; Derendajev, B.G.; Grigor'ev, I.A.; Shuchukin, G.I.; Volodarski, L.B.: Massenspektren von Derivaten des Imidazols. IV. 4-substituierte 2,2,5,5-Tetramethyl-3-

-
- imidazolin-1-oxyle. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. Nauk* **2**, 117-123 (1983).
- 42 Swartz, H.M.; Chen, K.; Hu, H.; Hideg, K.: Contrast Agents for Magnetic Resonance Spectroscopy: A Method to Obtain Increased Information in in Vivo and In Vitro Spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **22**, 001-006 (1991).
 - 43 Muller, R.N.; Haverbeke, Y.V.; Bonnet, P.A.; Chapat, J.-P.; Vallet, P.: Titration of Nitroxide Free Radicals by Nuclear Magnetic Relaxometry. *Anal. Chem.* **62**, 1671-1673 (1990).
 - 44 Bennett, H.F.; Brown, R.D.; Keana, J.F.W.; Koenig, S.H.; Swartz, H. M.: Interactions of nitroxide with Plasma and blood. Effect on $1/T_1$ of water protons. *Magn. Reson. Med.* **14**, 40-55 (1990).
 - 45 Lex, L.: Development of contrast enhancing agents in magnetic-resonance-imaging. *Acta Biochim. Biophys. Hungaria* **24**, 265-281 (1989).
 - 46 Breitmaier, E.: *Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen*. B.G.Teubner, Stuttgart, 1992.
 - 47 Rücker, G.: *Spektroskopische Methoden in der Pharmazie. Band I: Spektroskopie im sichtbaren und UV-Bereich, IR-Spektroskopie*. WVG, Stuttgart, 1976.
 - 48 Mitzner, R.; Röbisch, G.; Heilmann, D.: *Physikalisch-chemische Arbeitsmethoden*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1985.
 - 49 Frey, H.-P.; Zieloff, K.: *Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie, Grundlagen und Praxis*, VCH, Weinheim, 1993.
 - 50 *Firmeninformation "Chromatographie Zubehör"*, Macherey-Nagel GmbH&Co.,Düren.
 - 51 Van Horne, K.C. (Ed.): *Handbuch zur Festphasenextraktion*. ICT GmbH, Bad Homburg, 1993.
 - 52 Berardi, R.; Pawliszyn, J.: The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollution Research J. of Canada* **24**, 179 (1989).
 - 53 Arthur, C.L.; Pawliszyn, J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optic fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145 (1990).
 - 54 Louch, D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J.: Dynamics of organic compounds extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Anal. Chem.* **64**, 1187-1199 (1992).
 - 55 Popp, P.; Kauert, A.; Kalbitz, K.: Festphasenmikroextraktion (SPME). *GIT Labor-Fachzeitschrift* **4**, 325-331 (1995).
 - 56 Arthur, C.L.; Potter, D.W.; Buchholz, K.D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J.: Solid-phase microextraction for the direct analysis of water: Theory and Practice, *LC-GC* **10**, 656-661 (1992).

- 57 Eisert, R.; Levsen, K.: Festphasenmikroextraktion organischer Spuren aus wäßrigen Um- weltproben. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **6**, 581-588 (1996).
- 58 Potter, D.; Pawliszyn, J.: Detection of substituted benzenes in water at the pg/ ml level using solid phase microextraction and GC-ion trap mass spectrometer. *J. Chromatogr.* **625**, 247-255, (1992).
- 59 *Supelco-Application*, Note 6, 17, 56, 58, 61, 62 (1994).
- 60 Yashiki, M.; Kojima, T.; Miyazaki, T.; Nagasawa, N.; Iwasaki, Y.; Hara, K.: Detection of amphetamines in urine using head space-solid phase microextraction and chemical ionization selected ion monitoring. *Forensic Sci. Int.* **76**, 169-177 (1995).
- 61 Yasuda, N.; Otsuki, K.; Nishikawa, M.; Katagi, M.; Tsuchihashi, H.: Analysis of components in crude drugs by headspace solid phase microextraction method 1. *J. Pharm. Soc. Japan (Yakugaku Zasshi)* **116**, 251-254 (1996).
- 62 Zhang, Z.; Pawliszyn, J.: Headspace solid phase microextraction. *Anal. Chem.* **65**, 1843-1852 (1993).
- 63 Arthur, C.L.; Killam, L.; Buchholz, K.D.; Pawliszyn, J.: Automation and optimization of solid phase microextraction. *Anal. Chem.* **64**, 1960-1966 (1992).
- 64 Guo, F.; Gorecki, T.; Irish, D.; Pawliszyn, J.: Solid-phase microextraction combined with electrochemistry. *Anal. Commun.* **33**, 361-364 (1996).
- 65 Shirey, R.: Pestizidsampling vor Ort durch Festphasenmikroextraktion/ Kapillar-GC. *The Reporter* **16**, 6 (1997).
- 66 Göber, B.: Stabilität und Aufbewahrung von Arzneimitteln. In: *Kommentare zum Arzneibuch der DDR* (Ed.: Kny, L. und Richeter, J.), Heft 14, Akademie-Verlag Berlin, Berlin, 1987.
- 67 Grimm, W. und Schepky, G.: *Stabilitätsprüfung in der Pharmazie*. Editio Cator, Aulendorf, 1983.
- 68 Belkin, S.; Mehlhorn, R.J.; Hideg, K.; Hankovsky, O.; Packer, L.: Reduction and destruction rates of nitroxide spin probes. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 232-243 (1987).
- 69 Rozantsev, E.G.; Sholle, V.D.: Synthesis and reactions of stable nitroxyl radicals. *Synthesis* 190 (1971).
- 70 Mäder, K.: Untersuchungen zur Arzneistofffreisetzung aus biologisch abbaubaren Arzneiträgern in vitro und in vivo. Habilitation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1997.
- 71 Mäder, K.; Borchert, H.H.; Stößer, R.; Groth, N.; Herrling, T.: Model Studies of the Localization and Mobility of Drugs within Polymer Foils by EPR Tomography. *Die Pharmazie* **46**, 439-442 (1991).

- 72 Ando, W. (Editor): *Organic Peroxides*. John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1992.
- 73 Edwards, J.O. (Editor): *Peroxide Reaction Mechanisms*. Interscience Publishers, New York, London, 1962.
- 74 Church, D.F.: Substituent effects on nitroxide hyperfine splitting constants. *Bruker EPR application note* **106**.
- 75 Jaffè, H.H.: A Reexamination of the Hammett Equation. *Chem. Rev.* **53**, 191-261 (1953).
- 76 Pan, K; Lin, C.-R.; Ho, T.-I.: Substituent effects on ESR parameters of α -Pheny-N-tert-butyl nitron spin adducts. Resolution enhancement and mass spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **31**, 632-638 (1993).
- 77 Fish, J.R.; Swarts, S.G.; Sevilla, M.D.; Malinski, T.: Electrochemistry and spectroelectrochemistry of nitroxyl free radicals. *J. Phys. Chem.* **92**, 3745-3751 (1988).
- 78 Baur, J.E.; Wang, S.; Brandt, M.C.: Fast-Scan Voltammetry of cyclic nitroxide free radicals. *Anal. Chem.* **68**, 3815-3821 (1996).
- 79 Morris, S.; Sosnivsky, G.; Hui, B.; Huber, C.O.; Rao, N.U.M.; Swartz, H.M.: Chemical and electrochemical reduction rates of cyclic nitroxides (nitroxyls). *J. Pharm. Sci.* **80**, 149-152 (1991).
- 80 Henze, G.; Neeb, R.: *Elektrochemische Analytik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1986.
- 81 Neiman, M.B.; Mairanovskii, S.C.; Kovarskaja, B.M.; Rozantsev, E.G.; Gintsberg, E.G.: Polarographic study of some N-oxide free radicals, *Izv. Akad. Nauk S.S.S.R. Ser. Khim.*, 1518 (1964).
- 82 Shuchukin, G.I.; Grigor'ev, I.A.: Oxidation-reduction properties of nitroxides. In Volodarsky, L.B. (Ed.): *Imidazoline Nitroxides. Vol. I. Synthesis and Properties*. 171-214, CRC Press, Boca Raton, 1988.
- 83 Rauen, H.M.: *Biochemisches Taschenbuch*. Springer Verlag, Berlin, 1964.
- 84 Mehlhorn, R.J.: Ascorbate- and dehydroascorbic acid-mediated reduction of free radicals in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **266**, 2724-2731 (1991).
- 85 Zhang, Y.; Fung, L. W.-M.: The roles of ascorbic acid and other antioxidants in the erythrocyte in reducing membrane nitroxide radical. *Free Rad. Biol. Med.* **16**, 215-222 (1994).
- 86 Fuchs, J.; Mehlhorn, R.J.; Packer, L.: Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis skin homogenates. *J. Invest. Dermatol.* **93**, 633-640 (1989).
- 87 Winckler, B.S.; Orselli, S.M.; Rex, T.S.: The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Rad. Biol. Med.* **17**, 333-

-
- 349 (1994).
- 88 Corinne Mathieu: Dissertation, Universite de Provence (Aix-Marseille I), 1997.
 - 89 Okazaki, M.; Kuwata, K.: A stopped-flow Electron-Spin-Resonance Study on the reactivity of some nitroxide radicals with ascorbic-acid in the presence of beta-cyclodextrin. *J. Phys. Chem.* **89**, 4437-4440 (1985).
 - 90 Dictionary of Organic Compounds, 5.Ed., New, York, London, Ontario, 1982.
 - 91 Vianello, F.; Momo, F.; Scarpa, M.; Rigo, A.: Kinetics of nitroxide spin label removal in biological systems: An in vitro and in vivo ESR study. *Magn. Reson. Imaging* **13**, 219-226 (1995).
 - 92 Goldberg, J.S.; Rauckmann, E.J.; Rosen, G.M.: Bio reduction of nitroxides by Staphylococcus aureus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 198-202 (1977).
 - 93 Smith, R.V.; Rosazza, J.P.: Microbial models of mammalian metabolism. *J. Pharm Sci.* **64**, 1737-1759 (1975).
 - 94 Pfeifer, S.; Pflugel, P.; Borchert, H.-H.: *Grundlagen der Biopharmazie*. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1988.
 - 95 Wackett, L.P.; Gibson, D.T.: Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus Cunninghamella elegans. *Biochem. J.* **205**, 117-122 (1982).
 - 96 Borchert, H.-H.; Pohl, S.: Mikrobielle Modelle der Säugerbiotransformation. *Wiss. Zschr. Humboldt-Universität Berlin* **40**, 33-38 (1991).
 - 97 Cerniglia, C.E.; Campbell, W.L.; Freeman, J.P.; Evans, F.E.: Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus Cunninghamella elegans. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2275-2279 (1989).
 - 98 Borchert, H.-H.; Mäder, K.; Stösser, R.; Kroll, C.: Free radical intermediates in fungal metabolism as a model of mammalian drug metabolism, *Magn. Reson. Med. (Japan)* **6**, 375-377 (1995).
 - 99 Mäder, K.: Anwendungen der Elektronenspinresonanzspektroskopie und -tomographie in der Biopharmazie. Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1994.
 - 100 Elstner, E.F.: *Der Sauerstoff, Biochemie, Biologie, Medizin*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 1990.
 - 101 Kleber, H.P.; Schlee, D.; Schöpp, W.: *Biochemisches Praktikum*, 2. Aufl., Fischer Verlag, Jena, 1987.
 - 102 Frommer, U.; Ullrich, V.; Staudinger, H.: Hydroxylation of aliphatic compounds by liver microsomes. I. The distribution pattern of isomeric alcohols. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 903-912 (1970).
 - 103 Suelter, C.H.: *Experimentelle Enzymologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York,

-
- 1990.
- 104 Tinberg, H.M.; Melnick, R.L.; Maguire, J.; Packer, L.: Studies on mitochondrial proteins, II. Localization of components in the inner membrane: Labeling with diazobenzenesulfonate, a non-penetrating probe. *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 118-128 (1974).
 - 105 Shayiq, R.M.; Addya, S.; Avadhani, N.G.: Constitutive and inducible forms of cytochrome P-450 from hepatic mitochondria. *Meth. Enzymol.* **206**, 587-594 (1991).
 - 106 Hoppel, C.; Cooper, C.: Studies on the nucleotide specificity of mitochondrial inner membrane particels. *Arch. Biochem. Biophys.* **135**, 184-193 (1969).
 - 107 Iannone, A.; Tomasi, A.; Vannini, V.; Swartz, H.M.: Metabolism of nitroxide spin labels in subcellular fractions of rat liver, II. Reduction in the cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 290- 293 (1990).
 - 108 Schimmack, W.; Deffner, U.; Michailov, M.C.: Study of the decay of the nitroxyl free radical in whole rats and rat-tissue homogenates. *Int. J. Radiat. Biol.* **30**, 393-397 (1976).
 - 109 Dodd, N.J.F.; Marcus, R.G.; Preston, P.N.: Synthesis and electron spin resonance study of spin-labelled compounds related to tumour-growth inhibitory nitroarylaziridines. *Z. Naturforsch.* **31c**, 328-330 (1976).
 - 110 Testa, B.; Caldwell, J.: *Biochemistry of Redox Reactions*. Academic Press, 1995.
 - 111 Rekka, E. A.; Soldan, M.; Belai, I.; Netter, K.J.; Maser, E.: Biotransformation and detoxification of insecticidal metyrapone analogues by carbonyl reduction in the human liver. *Xenobiotika* **26**, 1221-1229 (1996).
 - 112 Rady-Pentek, P.; Mueller, R.; Tang, B.K.; Kalow, W.: Interindividual variation in the enzymatic 15-keto-reduction of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin E1 in human liver and in human erythrocytes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **52**, 147-153 (1997).
 - 113 Ruckpaul, K.: 20 years investigations on cytochrome P-450. *Die Pharmazie* **33**, 308-309 (1978).
 - 114 Ruckpaul, K.: The molecular organization of the liver microsomal monooxygenatic system. *Die Pharmazie* **33**, 310-312 (1978).
 - 115 Ruckpaul, K.; Rein, H.; Blanck, J.: Regulation mechanisms of the endoplasmic cytochrome P-450 systems of the liver. *Biomed. Biochim. Acta* **44**, 351-379 (1985).
 - 116 Ruckpaul, K.: Cytochrom P450 abhängige Enzyme- Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung. *PharmUZ* **5/6**, 296-304 (1993).
 - 117 Lipp, H.-P.; Schuler, U.: Die menschlichen Cytochrom-P450-Isoenzyme. *Arzneimitteltherapie* **9**, 272-280 (1995).

- 118 Testa, B.; Jenner, P.: Inhibitors of Cytochrome P-450s and their mechanism of action. *Drug Metab. Rev.* **12**, 1-117 (1981).
- 119 Rosen, G.M.; Rauckman, E.J.; Hanck, K.W.: Selective bio-reduction of nitroxides by rat liver microsomes. *Toxicol. Letters* **1**, 71-74 (1977).
- 120 Utsumi, H.; Shimakura, A.; Kashiwagi, M.; Hamada, A.: Localization of the active center of nitroxide radical reduction in rat liver microsomes: its relation to cytochrome P-450 and membrane fluidity. *J. Biochem.* **105**, 239-244 (1989).
- 121 Miura, Y.; Utsumi, H.; Kashiwagi, M.; Hamada, A.: Effects of oxygen on the membrane structure and the metabolism of lipophilic nitroxide in rat liver microsomes. *J. Biochem.* **108**, 516-518 (1990).
- 122 Iannone, A.; Bini, A.; Swartz, H.M.; Tomasi, A.; Vannini, V.: Metabolism in rat liver microsomes of the nitroxide spin probe Tempol. *Biochem. Pharm.* **38**, 2581-2586 (1989).
- 123 Iannone, A.; Tomasi, A.; Vannini, V.; Swartz, H.M.: Metabolism of nitroxide spin labels in subcellular fraction of rat liver, I. Reduction by microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 285-289 (1990).
- 124 Stier, A.; Sackmann, E.: Spin labels as enzyme substrates, heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 400-408 (1973).
- 125 Valvis, I.I.; Lischick, D.; Shen, D.; Sofer, S.S.: In vitro synthesis of nitroxide free radicals by hog liver microsomes. *Free Rad. Biol. Med.* **9**, 345-353 (1990).
- 126 Stier, A.; Reitz, I.: Radical production in amine oxidation by liver microsomes. *Xenobiotica* **1**, 499-500 (1971).
- 127 Stier, A.; Reitz, I.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **270**, R138 (1971).
- 128 Rosen, G.M.; Rauckmann, E.J.: Formation and reduction of a nitroxide radical by liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 675-678 (1977).
- 129 Jenner, P.; Gorrod, J.W.; Beckett, A.H.: Factors affecting the in vitro metabolism of R-(+)- and S-(-)-nicotine by guinea-pig liver preparations. *Xenobiotica* **3**, 563-572 (1973).
- 130 Ohno, T.; Imai, K.; Tochino, Y.; Aimoto, T.: Direct estimation by L-band ESR of free radical disposition in perfused rat partial liver. *Magn. Res. Med.* **8**, 63-66 (1997).
- 131 Mukhtar, H.; Agarwal, R.; Bickers, D.R.: Cutaneous metabolism of xenobiotics and steroids hormones. In: Pharmacology of the skin. (Mukhtar, H.; Ed.), 89-109, CRC Press, Boca Raton, 1992.
- 132 Schallreuter, K.U.; Pittelkow, M.R.; Gleason, F.K.; Wood, J.M.: The role of Calcium in the regulation of free radical reduction by thioredoxin reductase at the surface of the skin. *J.*

-
- Inorg. Chem.* **28**, 227-238 (1986).
- 133 Fuchs, J.; Freisleben, H.J.; Podda, M.; Zimmer, G.; Milbradt, R.; Packer, L.: Nitroxide radical biostability in skin. *Free Rad. Biol. Med.* **15**, 415-423 (1993).
 - 134 Schallreuter, K.U.; Wood, J.M.: The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 630-637 (1986).
 - 135 Schallreuter, K.U.; Pitelkow, M.R.; Wood, J.M.: Free radical reduction by thioredoxin reductase at the surface of normal and vitiliginous human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **87**, 728-732 (1987).
 - 136 Fuchs, J.: Free radical reduction by thioredoxin reductase. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 92-93 (1988).
 - 137 Fuchs, J.; Groth, N.; Herrling, Zimmer, G.: Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (Tempo) redox reactions in human skin. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, 967-976 (1997).
 - 138 Fuchs, J.; Mehlhorn, R.J.; Packer, L.: Assay for free radical reductase activity in biological tissue by electron spin resonance spectroscopy., In: Packer, L.; Glazer, A.N. (Eds.): *Oxygen radicals in biological systems. Part B - Oxygen radicals and antioxidants. Methods in Enzymology 168*. 670-675 , Academic Press, San Diego, 1992.
 - 139 Ankel, E.G.; Lai, C.-S.; Hopwood, L.E.; Zivkovic, Z.: Cytotoxicity of commonly used nitroxide radical spin probes. *Life Sci.* **40**, 495-498 (1987).
 - 140 Sies, H.; Mehlhorn, R.: Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 393-396 (1986).
 - 141 Breitskreutz, D.; Boukamp, P.; Hülsen, A.; Ryle, C.; Stark, H.-J.; Smola, H.; Thiekötter, G.; Fusening, N.E.: *Pharmaceutical Application of cell and tissue culture*, Plenum Press, London, 1989.
 - 142 Fusening, N.E.; Boukamp, P.; Breitskreutz, D.; Hülsen, A.; Petrusevska, S.; Cerutti, P.; Stanbridge, E.: In vitro transformation of human skin epithelial cells: role of RAS oncogene in malignant progression. *Toxicol. in Vitro* **4**, 627-634 (1990).
 - 143 Langner, A.: Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen. *PharmUZ* **24**, 207-218 (1995).
 - 144 Fuchs, J.; Huflejt, M.E.; Rothfuss, L.M.; Wilson, D.S.; Carcamo, G.; Packer, L.: Impairment of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **93**, 769-773 (1989).
 - 145 Harper, K.H.; Calcutt, G.: Conjugation of 3,4-benz-pyrenols in mouse skin. *Nature* **186**, 80 (1960).

- 146 Bock, K.W.; Burchell, B.; Dutton, G.J.; Hanninchen, O.; Mulder, G.J.; Owens, I.S.; Siest, G.; Tephyl, T.R.: UDP-glucuronyltransferase activities. Guidelines for consistent interim terminology and assay conditions. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 953-955 (1983).
- 147 Niedner, R.; Ziegenmeyer, J.: *Dermatika. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart, 1992.
- 148 Schallreuter, K.U.; Wood, J.M.: Free radical reduction in the human epidermis. *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 519-532 (1989).
- 149 Luthman, M.; Holmgren, A.: Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry* **21**, 6628-6633 (1982).
- 150 Rozell, B.; Holmgren, A.; Hansson, H.A.: Ultrastructural demonstration of thioredoxin and thioredoxin reductase in rat hepatocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* **46**, 470-477 (1988).
- 151 Holmgren, A. Björnstedt, M.: Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Methods in Enzymology* **252**, 199-208 (1995).
- 152 Holmgren, A.: Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J. Biol. Chem.* **252**, 4600-4606 (1977).
- 153 Oblong, J.E.; Gasdaska, P.Y.; Sherrill, G. Powis: Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry* **32**, 7271-7277 (1993).
- 154 Iannone, A.; Hu, H.; Tomasi, A.; Vannini, V.; Swartz, H.M.: Metabolism of aqueous soluble nitroxides in hepatocytes, effects of cell integrity, oxygen and structure of nitroxides. *Biochim. Biophys. Acta* **991**, 90-96 (1989).
- 155 Lepock, J.R.; Cheng, K.H.; Campbell, S.D.; Kruuv, J.: Rotational diffusion of Tempone in the cytoplasm of Chinese hamster lung cells. *Biophys. J.* **44**, 405-412 (1983).
- 156 Schulz, J.; Dettlaff, S.; Fritzsche, U.; Harms, U.; Schiebel, H.; Derer, W.; Fusenig, N.E.; Hülsen, A.; Böhm, M.: The amido black assay: a simple and quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation, and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (HaCaT) and other cell types growing adherently or in suspension. *J. Immunol. Meth.* **167**, 1-13 (1994).
- 157 Schulz, J.; Dettlaff, S.; Richter, A.; Schiebel, H.: Zwischenbericht zum PROLIMAB-Projekt: Proliferationsmodifizierende monoklonale Antikörper gegen humane transformierte Keratinozyten, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1993.
- 158 Braunbeck, Th.: *Zelltests in der Ökotoxikologie*. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, 1995.
- 159 Kawalek, J.C.; Andrews, A.W.: The effect of solvents on drug metabolism in vitro. *Drug*

-
- Metab. Dispos.* **8**, 380-384 (1980).
- 160 Chauret, N.; Gauthier, A. und Deborah, A. N.-G.: Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 1-4 (1998).
 - 161 Druckrey, E.: Regressionsanalyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Hansch-Analyse). *PharmUZ* **5**, 145-150 (1975).
 - 162 Borenfreund, E.; Puerner, J.A.: Toxicity determinend in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**, 119-124 (1985).
 - 163 Phillips, J.C.; Gibson, W.B.; Yam, J.; Alden, C.L.; Hard, G.C.: Survey of the QSAR and in vitro approaches for developing non-animal methods supersede the in vivo LD50 test. *Food Chem. Toxicol.* **28**, 375-394 (1990).
 - 164 Clothier, R.H.; Hulme, L.M.; Smith, M.; Balls, M.: Comparison of the in vitro cytotoxicities and acute in vivo toxicities of 59 chemicals. *Mol Toxicol* **1**, 571-577 (1987).
 - 165 Stötzer, H.: *Toxische Arzneimittelwirkungen - Grundlagen, Systematik, Experimente*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1995.
 - 166 Siems, W.; Schmidt, H.; Müller, M.; Henke, W.; Gerber, G.: H₂O₂ formation during nucleotide degradation in the hypoxic rat liver: aquantitative approach. *Free Rad. Res. Communs.* **1**, 289-295 (1986).
 - 167 Bindoli, A.; Rigobello, M.P.; Galzigna, L.: Toxicity of aminochromes. *Toxicol. Lett.* **48**, 3-20 (1989).
 - 168 Boveris, A., Cadenas, E.: Mitochondrial production of superoxide anions and ist relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* **54**, 311-314 (1975).
 - 169 Siems, W.G.; Sommerburg, O.; Mayer, H.; Grune, T.: Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *PZ* **143**, 11-25 (1998).
 - 170 Quintanilha, A.T.; Packer, L.: Surface localization of sites of reduction of nitroxide spin-labeled molecules in mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 570-574 (1977).
 - 171 Chapman, D.A.; Killian, G.J.; Gelerinter, E.; Jarret, M.T.: Reduction of the spin-label TEMPONE by ubiquinol in the electron transport chain of intact rabbit spermatozoa. *Biol. Reprod.* **32**, 884-893 (1985).
 - 172 Chen, K.; Glockner, J.F.; Morse, P.D.; Swartz, H.M.: Effects of oxygen on the metabolism of nitroxide spin labels in cells. *Biochemistry* **28**, 2496-2501 (1989).
 - 173 Chen, K.; Swart, H.M.: Oxidation of hydroxylamines to nitroxide spin labels in living cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 285-289 (1990).
 - 174 Keith, A.; Bulfield, G.; Snipes, W.: Spin-labeled Neurospora mitochondria. *Biophysical J.* **10**, 618-629 (1970).

- 175 Samuni, A.; Krishna, C.M.; Mitchell, J.B.; Collins, C.R.; Russo, A.: Superoxide reaction with nitroxides. *Free Rad. Res. Commun.* **9**, 241-249 (1990).
- 176 Rashba-Step, J.; Turro, J.T.; Cederbaum, A.I.: ESR studies on the production of reactive oxygen intermediates by rat liver microsomes in the presence of NADPH or NADH. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 391-400 (1993).
- 177 Nohl, H.; Hegner, D.: Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo. *Eur. J. Biochem.* **82**, 563-567 (1978).
- 178 Nohl, H.; Jordan, W.: The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 533-539 (1986).
- 179 Beyer, R. E.: An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem. Cell Biol.* **70**, 390-403 (1992).
- 180 Rosen, G.M.; Finkelstein, E.; Rauckman, E.J.: A method for the detection of superoxide in biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **215**, 367-378 (1982).
- 181 Nohl, H.; Koltover, V.; Stolze, K.: Ischemia/ reperfusion impairs mitochondrial energy conservation and triggers O₂·- release as a byproduct of respiration. *Free Rad. Res. Comms.* **18**, 127-137 (1993).
- 182 Nilsson, U.A.; Olsson, L.-I.; Thor, H.; Moldeus, P.; Bylund-Fellenius, A.-C.: Detection of oxygen radicals during reperfusion of intestinal cells in vitro. *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 251-259 (1989).
- 183 Konstantinov, A.A.; Peskin, A.V.; Popova, E.Yu.; Khomutov, G.B.; Ruuge, E.K.: Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **894**, 1-10 (1987).
- 184 Carloni, P.; Damiani, E.; Greci, L.; Stipa, P.: Chemical and electrochemical study on the interactions of aminoxyls with superoxide anion. *Tetrahedron* **52**, 11258-11264 (1996).
- 185 Weber, G.F.; Bruch, H.-P.: Die Pharmakologie der Superoxid-Dismutase. *Die Pharmazie* **47**, 159-167 (1992).
- 186 Swartz, H.M.; Chen, K.; Pals, M.; Sentjurs, M.; Morse, P.D.: Hypoxia-sensitive NMR contrast agents. *Magn. Res. Med.* **3**, 169-174 (1986).
- 187 Falbe, J., Regitz, M.: *Römpf Chemie Lexikon*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1989.
- 188 Groß, W.; Ring, K.; Lodemann, E.: *Physiologische Chemie*. VCH, Weinheim, 1989.
- 189 Ilivicky, J.; Casida, J.E.: Uncoupling action of 2,4-dinitrophenols, 2-trifluoromethylbenzimidazoles and certain other pesticide chemicals upon mitochondria from different sources and its relation to toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 1389-1401 (1969).
- 190 Hsia, J.C.; Chen, W.L.; Wong, L.T.; Long, R.A.; Kalow, W.: Synthesis of spin labelled

- 2,4-dinitrophenols and their activities in the uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 1273-1279 (1972).
- 191 Nohl, H.; Jordan, W.: The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur. J. Biochem.* **111**, 203-210 (1980).
- 192 Turrens, J.F.; Freeman, B.A.; Levitt, J.G.; Crapo, J.D.: The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 401-410 (1982).
- 193 Raschba, Yu.E.; Vartanyan, L.S.; Bayder, L.M.; Krinitskaya, L.A.: Quantitative estimation of the rate of superoxide radical generation in mitochondrial membranes by ESR-technique. *Bifizika* **34**, 57-62 (1989).
- 194 Ksenzenko, M.Yu.; Konstantinov, A.A.; Khomutov, G.B.; Ruuge, E.K.: Studies of superoxide radical generation in the NADH:ubiquinone reductase segment of the respiratory chain with the aid of a spin probe, 2,2,6,6,-tetramethyl-4-oxopiperidine-N-oxyl. *Biol. Membr.* **6**, 840-846 (1989).
- 195 Nohl, H.; Jordan, W.; Hegner, D.: Mitochondrial formation of OH• radicals by an ubisemiquinone-dependent reaction. An alternative pathway to the iron-catalyzed Haber-Weiss. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 599-607 (1982).
- 196 *Bericht zum DFG-Projekt Bo 1350/1-1: Beiträge zur In-vitro- und In-vivo-ESR-Spektroskopie und -Tomographie unter besonderer Berücksichtigung der Stabilität, Biotransformation und Pharmakokinetik von Spinsonden und -traps. (Bearbeitungszeitraum 06.1995 - 05.1997)* Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1997.
- 197 Henke, W.; Mäder, K.; Nickel, E.; Stößer, R.: Effects of nitroxide spin labels on respiration of renal cortical mitochondria. In : Nohl, H. und Esterbauer H. (Eds.), *Book of Abstracts: International Conference on critical aspects on free radicals in chemistry , biochemistry and medicine, 14-17.2.1993.* Wien, 1993.
- 198 Feldman, A.; Wildman, E.; Bartolinini G.; Piette, L.H.: In vivo electron spin resonance in rats. *Phys. Med. Biol.* **20**, 602-612 (1975).
- 199 Takeshita, K.; Utsumi, H.; Hamada, A.: ESR measurement of radical clearance in lung of whole mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 874-880 (1991).
- 200 Cieszka, K.; Elas, M.; Wojcik, K.; Markowska, E.; Dubis, K.; Lukiewicz, S.L.: Whole-body S-band in vivo epr studies on bioreduction of nitroxides in mice. I. Parameters determining kinetics of the process. *Current Topics in Biophysics* **18**, 59-67 (1994).
- 201 Cieszka, K.; Elas, M.; Wojcik, K.; Markowska, E.; Dubis, K.; Lukiewicz, S.L.: Whole-body S-band in vivo epr studies on bioreduction of nitroxides in mice.II. Saturation of murine organism with nitroxides. *Current Topics in Biophysics* **18**, 68-73 (1994).
- 202 Komarov, A.M.; Joseph, J.; Lai, C.-S.: In vivo pharmacokinetics of nitroxides in mice.

-
- Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1035-1042 (1994).
- 203 Mäder, K.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: Transcutaneous absorption of nitroxide radicals detected in vivo by means of X-band ESR. *Die Pharmazie* **47**, 12 (1992).
- 204 Mäder, K.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: Detection of free radicals in living mice after inhalation of DTBN by X-band ESR. *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 339-342 (1993).
- 205 Yamaguchi, T.; Itai, S.; Hayashi, H.; Soda, S.; Hamada, A.; Utsumi, H.: In vivo ESR studies on pharmacokinetics and metabolism of parenteral lipid emulsion in living mice. *Pharm. Res.* **13**, 729-733 (1996).
- 206 Gallez, B.; Keyser, J.-L.; Debuyst, R.; Dejehet, F.; Neuvens, L.; Dumont, P.: The effect of pasteurisation on albumin: an EPR binding assay for polymeric albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13**, 1449-1452 (1995).
- 207 Schieweck, A.: Untersuchungen zur Analytik, Stabilität, Pharmakokinetik und Biotransformation von Z-2-Amino-5-chlorbenzophenonamidinohydrazon. *Dissertation*, Humboldt-Universität zu Berlin, 1994.
- 208 Zhang, Y.; Fung, W.-M.: The roles of ascorbic acid and other antioxidants in the erythrocyte in reducing membrane nitroxide radicals. *Free Rad. Biol. Med.* **16**, 215- 222 (1994).
- 209 Hoch, M.J.R.; Ewert, U.: Resolution in EPR Imaging. In: Eaton, G.R.; Eaton, S.S.; Ohno, K. (Eds.), *EPR Imaging and in-vivo-EPR*. 153-159, CRC Press, Boca Raton, 1991.
- 210 Galster, H.: *pH-Messung - Grundlagen, Methoden, Anwendungen, Geräte*. VCH, Weinheim, 1990.
- 211 Schwabe, K.: *pH-Messung*. Akademie-Verlag Berlin, Berlin, 1980.
- 212 Furkert, K.; Jandura, R.; Schmitz, B.: Allgemeine Methoden zur pharmazeutisch-technologischen und physikalischen Prüfung von Gesundheitspflegemitteln mit Kennbuchstaben „K“. *Zbl. Pharm.* **114**, 917-923 (1975).
- 213 Wolf, B.; Finke, I.: Beiträge zur pH-Messung in W/L-Emulsionssalben. *Die Pharmazie* **48**, 218-220 (1993).
- 214 Mücke, H.; Mohr, K.-T.; Rümmler, A.; Wutzler, P.: Untersuchungen über den Haut-pH-Wert der Hand nach Anwendung von Seife, Reinigungs- und Händedesinfektionsmitteln. *Die Pharmazie* **49**, 468-469 (1993).
- 215 Madden, A.; Leach, M.O.; Sharp, J.C.; Collins, D.J.; Easton, D.: A quantitative analysis of the accuracy of in vivo pH measurements with ³¹P NMR spectroscopy: assessment of pH measurement methodology. *NMR Biomed.* **4**, 1-11 (1991).
- 216 Jayasundar, R.; Hall, L.D.; Bleehen, N.M.: Comparison of pH measurements made using ³¹P NMR and a fibreoptic pH meter. *NMR Biomed.* **5**, 360-363 (1992).

- 217 Cafiso, D.S.: Electron Spin Resonance Methods for Measuring pH Gradients, Transmembrane Potentials, and Membrane Dynamics. *Methods in Enzymology* **172**, 331-345 (1989).
- 218 Khramtsov, V.V.; Marsh, D.; Weiner, L.; Grigoriev, I.A.; Volodarsky, L.B.: Proton exchange in stable nitroxyl radicals. EPR study of pH of aqueous solutions. *Chem. Phys. Lett.* **91**, 69-72 (1982).
- 219 Khramtsov, V.V.; Weiner, L.: Proton exchange in stable nitroxyl radicals: pH-sensitive spin probes. In: Volodarsky, L.B. (Ed.), *Imidazoline Nitroxides, Vol. II*, 37-80, CRC Press, Boca Raton, 1988.
- 220 Khramtsov, V.V.; Marsh, D.; Weiner, L.; Reznikov, V.A.: The application of pH-sensitive spin labels to studies of surface potential and polarity of phospholipid membranes and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 317-324 (1992).
- 221 Volodarsky, L.B.; Khramtsov, V.V.: Letter to the editor. *EPR Newsletter* **4**, 7 (1992).
- 222 Castle, J.D.; Hubbel, W.L.: Estimation of membrane surface potential and charge density from the phase equilibrium of a paramagnetic amphiphile. *Biochemistry* **15**, 4818-4831 (1976).
- 223 Schanding, T.; Vogel, P.D.; Trommer, W.E.; Wise, J.G.: Synthesis of a pH-Sensitive Spin-labeled Cyclohexylcarbodiimide Derivate for Probing Protonation Reactions in Proton-Pumping Enzymes. *Tetrahedron* **52**, 5783-5792 (1996).
- 224 Surmann, J.P. und Bosse, I.: Abfall des pH-Wertes wäßriger Salzlösungen in Ampullen. *Pharm. Ind.* **54**, 886-889 (1992).
- 225 Baucke, F.G.K.: Konstante pH-Werte wäßriger Salzlösungen in Ampullen aus Neutralglas. *Pharm. Ind.* **54**, 66-68 (1992).
- 226 Bosse, I.: Untersuchungen zur Stabilität von Thiosulfat-Infusionslösungen unter besonderer Berücksichtigung des Primärpackmittels Glas. Promotion, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, 1991.
- 227 Mäder, K.: Untersuchungen zur Arzneistofffreisetzung aus biologisch abbaubaren Arzneiträgern in vitro und in vivo. Habilitation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 1998.
- 228 Mader, K.; Gallez, B.; Liu, K.J.; Swartz, H.M.: Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biomaterials* **17**, 457-461 (1996).
- 229 Foster, M.A.; Grigori'ev, I.A.; Lurie, D.J.; McCallum, S.; Panagiotis, I.; Koptioug, A.; Hutchinson, J.M.S.; Nicholson, I.: In Vivo Detection of a pH-Sensitive Nitroxide in the Rat Stomach by Low-Field ESR-based Techniques. *Abstract of the EPR Workshop on In Vivo EPR and Related Studies, 14-18 September 1998, Dartmouth College Hanover,*

-
- 1998.
- 230 Freisleben, H.-J.; Groth, N.; Fuchs, J.; Rudolph, P.; Zimmer, G.; Herrling, T.: Penetration of Spin-labeled Dihydrolipoate into the Skin of Hairless Mice. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* **44**, 1047-1050 (1994).
 - 231 Michet, C.; Groth, N.; Herrling, T.; Rudolph, P.; Fuchs, J.; Kreuter, J.; Freisleben, H.-J.: Penetration of Spin-labeled retinoic acid from liposomal preparations into the skin of SKH1 hairless mice, Measurement by EPR tomography. *Int. J. Pharm.* **98**, 131-139 (1993).
 - 232 Gregoriadis, G.: *Liposome Technology Vol. I-III*, 2.Auflage, CRC Press, Boca Raton, 1993.
 - 233 Philippot, J.R.; Schuber, F.: *Liposomes as tools in basic research and industry*, CRC Press, Boca Raton, 1995.
 - 234 Mezei, M.; Gulasekhar, V.: Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci.* **26**, 1473-1477 (1980).
 - 235 Raab, W.: Liposomen - eine neue Form dermatologischer Wirkstoffträger. *Ärztliche Kosmetologie* **18**, 213-224 (1988).
 - 236 Schäfer-Korting, M.; Korting, H.C.; Braun-Falco, O.: Liposome preparations: A step forward in topical drug therapy for skin disease ? *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 1271-1275 (1989).
 - 237 Lautenschläger, H.: Der Einsatz von Liposomen in der Dermopharmazie. *Österr. Apoth. Ztg.* **44**, 589-600 (1990).
 - 238 Barry, B.W.: Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Rel.* **6**, 85 (1987).
 - 239 Junginger, H.E.; Hofland, H.E.J.; Bouwstra, J.A.: Wechselwirkungen von Liposomen und Niosomen mit der Haut. *Dt. Apotheker. Ztg.* **131**, 132-135 (1991).
 - 240 Lasch, J.; Laub, R.; Wohlrab, W.: How deep do intact liposomes penetrate into human skin ? *J. Control. Release* **18**, 55-58 (1991).
 - 241 Schaefer, H.; Stüttgen, G.; Zesch, A.; Schalla, W.; Gazith, J.: Quantitative determination of percutaneous absorption of radiolabeled drugs in vitro and in vivo by human skin. *J. Curr. Probl. Dermatol.* **7**, 80-94 (1978).
 - 242 Wohlrab, W.; Lasch, J.; Taube, K.-M.; Wozniak, K.-L.: Hautpermeation von liposomal inkorporiertem Hydrocortison. *Die Pharmazie* **44**, 333-335 (1989).
 - 243 Khramtsov, V.V.; Panteleev, M.V.; Weiner, L.M.: ESR study of proton transport across phospholipid vesicle membranes. *J. Biochem. Biophys. Meths.* **18**, 237-246 (1989).
 - 244 Santus, G.C.; Baker, R.W.: Transdermal enhancer patent literature. *J. Control. Release*

- 25**, 1-20 (1993).
- 245 Spielmann, H.: Nicht mit Tieren: toxikologische In-vitro-Prüfung von Kosmetika. *PZ* **46**, 11-15 (1998).
- 246 Gallez, B.; Mäder, M.; Swartz, H.M.: Noninvasive Measurement of the pH inside the Gut by Using pH-Sensitive Nitroxides. An in Vivo EPR Study. *Magn. Reson. Med.* **36**, 694-697 (1996).
- 247 *Proceedings of the EPR Workshop on In Vivo EPR and Related Studies, 14-18.9.1998*, Dartmouth College Hanover, NH/ USA, 1998.
- 248 Donike, M.; Gola, R.; Jaenicke, L.: Determination of indolalkylamines after selective derivatisation. *J. Chromatogr.* **134**, 385-395 (1977).
- 249 Brezina, M.; Zuman, P.: *Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie*. Akademische Verlagsgesellschaft Geest u. Portig KG, Leipzig, 1956.
- 250 Langner, A.; Nerlich, Ch.; Grahlmann, D.: Zur Biotransformation des Trapidil (Rocornal®)-Derivates AR 12463 an der isolierten perfundierten Rattenleber und der Rattenhepatozytensuspensionskultur. *Die Pharmazie* **45**, 8 (1990).
- 251 Holmgren, A. Björnstedt, M.: Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Methods in Enzymology* **252**, 199-208 (1995).
- 252 Suelter, C.H.: *Experimentelle Enzymologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1990.